

Série A, n° 4199
N° d'ordre : 5050

THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

Le grade de docteur ès Sciences Naturelles

PAR

Jean RICHARD

1^{re} THESE

Les isozymes de la lactico-déshydrogénase
dans le système nerveux

Activités et rapports avec les protéines hydrosolubles
et les éléments minéraux

Soutenue le 27 MAI 1964 devant la commission d'examen

M. SOULAIRAC, Président
MM. STOLKOWSKI et ACHER, Examineurs

IMPRIMERIE DES SCIENCES s.a.
75, AVENUE EMILE DE BECO
BRUXELLES

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THESES

PRESENTEES

**A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS**

POUR OBTENIR

Le grade de docteur ès Sciences Naturelles

PAR

Jean RICHARD

1^{re} THESE

**Les isozymes de la lacticodéshydrogénase
dans le système nerveux**

**Activités et rapports avec les protéines hydrosolubles
et les éléments minéraux**

Soutenue le devant la commission d'examen

M. SOULAIRAC, Président
MM. STOLKOWSKI et ACHER, Examineurs

IMPRIMERIE DES SCIENCES s.a.
75, AVENUE EMILE DE BECO
BRUXELLES

1964

A ma Tante.



Avant-propos

M. Soulairac, professeur de Psychophysiologie à la Faculté des Sciences de Paris, a bien voulu accepter la présidence de cette thèse. Nous voudrions lui exprimer ici toute notre respectueuse reconnaissance pour l'honneur qu'il nous a fait, pour l'accueil qu'il nous a toujours réservé, pour le soutien qu'il nous promet dans l'avenir.

M. le professeur Stolkowski, directeur du Laboratoire de Physiologie Chimique et M. le professeur Acher ont bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examen. Nous les prions de croire à notre respectueuse gratitude.

M. le professeur L. van Bogaert, directeur du Service Neurologique et des laboratoires de recherche de l'Institut Bunge, a permis que nous participions aux diverses activités de ces derniers. Sans lui, ce travail n'aurait pas été possible. Pour l'exemple qu'il nous a donné d'une curiosité étendue à tous les domaines et d'une connaissance approfondie des problèmes neurologiques, pour l'intérêt qu'il nous a toujours porté, nous tenons à le remercier très sincèrement et l'assurer de nos sentiments respectueusement reconnaissants. A travers lui, notre souvenir va également à tous ceux — médecins et laborantines — dont il a su s'entourer, que ce soit de façon stable ou temporaire.

Tout particulièrement, nous voudrions exprimer notre vive reconnaissance à M. le professeur Löwenthal, chargé de cours à l'Université de Bruxelles, qui dirige le laboratoire de Neurochimie de l'Institut Bunge. Il nous a initié à cette discipline toute nouvelle et généreusement fait profiter de ses connaissances dans ce domaine. Dans l'élaboration de cette thèse, il ne nous a pas ménagé ses conseils et a su, dans nos discussions, allier une attitude dénuée de tout dogmatisme à une critique constante des résultats. Toute notre gratitude lui est acquise pour cela, et pour nous avoir fait participer à l'esprit dont il anime son laboratoire.

A M. Verecken, directeur du Service des Relations Internationales du Ministère de l'Education Nationale et de la Culture, nous tenons à adresser nos respectueux remerciements pour l'accueil courtois qu'il

nous a toujours réservé. Ceux-ci vont également à M. Bertouille, rédacteur du Service des Relations Internationales, dont nous avons été dépendant de façon plus étroite et dont l'amabilité fut à l'origine d'une sincère amitié.

Inlassablement, M^{lle} Karcher et M. Van Sande, docteurs ès Sciences, nous ont apporté leur aide et leurs encouragements. Nous les en remercions et les prions de trouver ici l'expression de notre profonde amitié.

Très sincères, nos remerciements s'adressent également à M^{me} Goo-vaert et M^{lle} De Petter pour leur aide technique.

Nous tenons, aussi, à dédier ce travail à tous les assistants étrangers. Qu'ils soient évoqués en dernier, ne signifie pas qu'ils le sont dans notre souvenir. Que MM. Alberca (Murcie), Bignami (Rome), Bokonjic (Sarajevo), Breton (Paris), Canal (Milan), Castan (Montpellier), M^{lle} Dombska (Varsovie) ainsi que MM. Escalante (Lima), Fabiani (Florence), Gambetti (Bologne), Kalicanin (Skopje), Murofuschii (Tokyo), Neimarevic (Zagreb), Soano Tome (Lisbonne) et Tokitoh (Hirosaki) trouvent là un témoignage de notre amitié et de notre désir de voir persister les liens chaleureux créés entre nous pendant notre séjour commun à l'Institut Bunge.

CHAPITRE PREMIER

Position du problème

En une trentaine d'années, à partir de 1920, les principales propriétés physicochimiques et cinétiques de la lactico-déshydrogénase (LDH) ont été définies. Ce fut l'œuvre surtout de Warburg et Christian isolant et établissant la formule de son coenzyme, le NAD, de Karrer apportant la preuve que la saturation du carbone en ortho du noyau pyridine expliquait le passage du NAD à sa forme réduite ou NADH^2 , de Theorell, de Loewus étudiant le mode d'union du NAD avec son apoenzyme, de Straub mettant au point une technique de cristallisation de cette « pyridinoprotéine » dont, ultérieurement, Von Euler, Neilands, Hakala et Pfeleiderer approfondirent la cinétique.

Intimement liée au métabolisme anaérobie du fait de sa situation dans la glycolyse, la LDH intrigua les neurochimistes lorsqu'il s'avéra qu'elle présentait une activité certaine dans le cerveau, organe fortement irrigué et de ce fait bien oxygéné. Si McIlwain aborda analytiquement le problème, Balazs et Richter ont tenté de cerner l'aspect dynamique de cette glycolyse cérébrale. Ces recherches furent grandement facilitées par le fait que la plus grande partie de l'activité lactico-déshydrogénasique est localisée, comme l'a montré Johnson, dans le surnageant lors des centrifugations différentielles des homogénats cérébraux.

Ces problèmes de structure de la LDH et de son mode d'activité dans le tissu nerveux, déjà complexes en eux-mêmes, furent rendus plus difficiles lorsque Meister en 1950 et Neilands en 1952 publièrent leurs résultats prouvant que cet enzyme pouvait exister sous forme de plusieurs composants, séparables électrophorétiquement, dont l'existence fut confirmée en 1959 par Markert qui leur donna le nom « d'isozymes ». Très vite, en effet, à l'instar de ce qui existe dans les autres organes, il fut évident que la LDH cérébrale présentait des activités isozymiques. Restant dans la ligne générale de ces recherches neurochimiques, l'objet de cette thèse sera de considérer

les isozymes de la LDH du système nerveux, non pas sous l'angle structural, mais sous celui des activités. Une étude de structure demande un appareillage important et n'est possible que dans de grands laboratoires spécialisés, tels ceux de Markert aux Etats-Unis et de Pfeleiderer en Allemagne, qui ont déjà apporté des résultats substantiels. Plus accessible, en fait, est l'étude des activités isozymiques.

Essentiellement, cette étude sera basée sur le fait avancé par Wroblewski que chaque organe présente une disposition spécifique des activités isozymiques de la LDH. Tant chez l'homme que chez l'animal, nous envisagerons tout d'abord si les résultats des enzymoélectrophorèses, pour employer un néologisme proposé par Wieme, permettent de vérifier ce principe dans le système nerveux. Ultérieurement, au cas où il n'en serait pas ainsi, nous considérerons les raisons possibles de cette exception en utilisant les résultats obtenus soit dans le domaine des protéines hydrosolubles, soit dans celui des métaux. Notre but serait alors d'essayer de dégager des liaisons dynamiques entre ces divers éléments dans le cadre de l'hypothèse d'une compartimentation cérébrale régionale ou même subcellulaire émise par Waelsch et par Tower, Wherett et McKhann.

Après un historique général de la question et un chapitre où seront exposées les techniques utilisées, ce travail comportera donc trois grandes parties. La première réservée aux résultats tant normaux que pathologiques obtenus pour le tissu cérébral humain et animal. La seconde à l'étude statistique de ces derniers. La troisième, enfin, à une discussion générale.

CHAPITRE II

Historique

Travaillant sur la lacticodéshydrogénase du myocarde de bœuf, obtenue cristallisée par la méthode de Straub, Meister (1950), Neilands (1952), Markert (1960) ont montré que la solution de cette dernière, après « salting out », présente deux composants ayant chacun une activité enzymatique, mais des mobilités électrophorétiques différentes. Ces deux composants ne peuvent être séparés par recristallisation, mais, cristallisés séparément, ils migrent avec leur mobilité propre. Neilands nomme ces deux fractions A et C, puisque se déplaçant respectivement vers l'anode et la cathode, Meister et Markert, A et B, ce dernier auteur trouvant une troisième fraction à la limite de la résolution.

TABLEAU I

	A			B			C
	MEISTER	NEILANDS	MARKERT	MEISTER	NEILANDS	MARKERT	MARKERT
% protéine totale	±5	75	85	15	25	14	1
Taux SO ₄ (NH ₄) 2 pr fract.	-	0,40	-	-	0,43	-	-
Constante sédimentation(1)	6,48	7,0	7,0	6,36	7,0	7,1	-
Constante diffusion(2)	-	5,30	5,10	-	-	5,15	-
Volume partiel spécifique(3)	-	-	0,750	-	-	0,750	-
Poids moléculaire	-	135.000	134.000	-	-	134.000	-
Point isoélectrique	-	4,5	4,5	-	4,8	4,8	-
Coefficient frottement	-	-	1,2	-	-	1,2	-
Mobilité électrophorétique(4)	-	-	4,9	-	-	4,0	-
Coefficient extinction molaire(5)	-	-	2,10	-	-	1,96	-
Constante de Michaelis-Menten							
lactate (6)	-	-	1,5	-	-	1,7	-
pyruvate(7)	-	-	5,0	-	-	5,4	-
Turn over(8)	-	12.800	-	-	8.100	-	-
Inhibition(%)							
ac. oxamique(9)	-	-	80	-	-	80	-
p chloromercuribenzoate(10)	-	-	41	-	-	43	-

(1)- S20w.10-13 cm/sec. (2)- D20w. 10-7 cm²/sec. (3)- W20 ml/g.
 (4)- tampon phosphate pH 7,02 $\mu=0,07$ -.10-5 cm/volt/sec.
 (5)- ϵ .105 mole/litre - 280 m μ . (6)-.10-3 M. (7)-. 10-5 M.
 (8)- 25°C-pH . (9)- 1.10-3 M. (10)- 8.10-4 M.

Les propriétés de ces composants (tabl. I) montrent de façon évidente leur grande similitude. Que deux molécules ayant une activité enzymatique puissent posséder des mobilités électrophorétiques différentes et des propriétés physicochimiques sensiblement identiques posent de gros problèmes. Les résoudre est l'objet de l'enzymologie actuelle. On doit à Markert et Möller d'avoir imaginé le vocable pratique « d'isozyme », pour ces composants, et surtout d'avoir en 1959 tenté de faire une mise au point de la question. Ce terme « isozyme », au cours d'un symposium consacré à ce sujet, a été critiqué par certains auteurs étrangers qui ont voulu le remplacer par celui « d'isoenzyme ». En fait, comme le remarque Polonovski, ces deux appellations sont impropres. Dans la nomenclature chimique, le préfixe « iso » évoque toujours la notion d'isomérisie. Ce n'est pas le cas ici. Pour être exact, il faudrait plutôt utiliser l'expression proposée par Machebœuf « d'icéloenzyme ». Elle indique mieux l'idée de molécules presque identiques.

I. — Problème général des isozymes

En fait, l'isolement des isozymes est intimement lié aux progrès réalisés dans le domaine de la chromatographie, de l'électrophorèse ainsi que dans celui de l'établissement des structures primaires des polypeptides. Comme l'ont montré White et Gross pour l'ACTH Ozawa et Satake pour l'hémoglobine, Harris, Sanger et Naughton pour l'insuline, Acher pour la mélanostimuline, ces progrès peuvent se traduire dans le fait que, selon l'espèce, plusieurs acides aminés d'une protéine donnée — parfois même un seul — peuvent différer, et cela dans une position fixe de la chaîne peptidique. Ce type de changement moléculaire primaire peut même extérioriser « l'évolution » d'une protéine donnée. Ainsi, la natriférine ou vasotocine, hormone hypophysaire de la grenouille réglant le passage du sodium et de l'eau au travers de la peau, a une formule hybride de vasopressine et d'ocytocine. Existant chez le poulet à un taux moindre, elle disparaît chez les mammifères où s'individualisent l'ocytocine et la vasopressine. Ces deux dernières, comme l'ont montré Du Vigneaud et Tuppy-Du Vigneaud, Acher et Chauvet-Popenoe, Lawler et Du Vigneaud, sont des nonapeptides à pont disulfure 1-6 ne différant que par les résidus 3 et 8 : isoleucine et leucine pour l'ocytocine, phénylalanine et arginine pour la vasopressine. Si l'ocytocine est identique pour tous les mammifères, la vasopressine présente chez le porc un résidu lysine en position 8. Il y a donc là une véritable base moléculaire de l'évolution de la fonction excrétrice. Des anomalies du même genre

se retrouvent au sein d'une même espèce. Si, en 1949, Pauling, Itano et Pauling, révèlent que l'anémie falciforme est caractérisée par une hémoglobine particulière — l'hémoglobine S (ou B) —, en 1954, Bergren, Sturgeon et Itano précisent qu'en cas d'hétérozygotisme l'hémoglobine dans cette affection se présente sous forme de deux pics électrophorétiques : l'un avec tous les caractères de l'hémoglobine normale ou hémoglobine A, l'autre propre à l'hémoglobine pathologique ou hémoglobine S. Hunt et Ingram prouvent ultérieurement que cette anomalie de l'hémoglobine réside uniquement dans la substitution d'un acide aminé de la chaîne β .

Dans cet ordre d'idées, à ce jour, on sait qu'une trentaine d'enzymes possèdent des isozymes. Bien que cette propriété se rencontre surtout dans les transférases, on la retrouve aussi dans les enzymes de condensation et les isomérases. Ainsi dans le groupe des hydrolases : les estérases (Hunter et Markert-Markert et Hunter), la ribonucléase (Hirs, Stein et Moore-Martin et Porter-Hirs, Moore et Stein), la pepsine (Desreux et Herriott), la chymotrypsine (Kunitz), la trypsine (Timasheff, Sturtevant et Bier), le lysozyme (Tallan et Stein), la β -glucuronidase (Moore et Lee), la leucine aminopeptidase (Kowlessar, Haeffner et Riley). Dans celui des transférases proprement dites, l'hexokinase (Moore et Angeletti-Trayser et Colowick-Kaji, Trayser et Colowick), la glutamique-oxalacétique transaminase (Moore et Lee), la phosphatase alcaline (Schlamowitz-Schlamowitz et Bodansky), la phosphatase acide (Moore et Angeletti), l'aspartokinase (Stadtman, Cohen et Le Bras). Dans le groupe des oxydoréductases, les déshydrogénases de l'acide isocitrique (Markert et Moller-Avron et Jagendorf), malique, (Hess-Vesell et Bearn), lactique (Meister-Neilands-Wieland et Pfeleiderer-Pfeleiderer et Jeckel-Haupt et Giersberg-Vesell et Bearn-Sayre et Hill-Hess-Hill), du phosphoglycéraldéhyde (Krebs), de la xanthine (Mitidieri, Riberio, Affonso et Villela), du glucose 6-phosphate et du 6-phosphogluconate (Moore et Angeletti) du sorbitol, de l'acide glutamique (Van Der Helm), les peroxydases (Kondo et Morita-Jermyn et Thomas-Garayet Farago-Paul-Markert et Moller-Galston et McCune), les catalases (Paul et Fottrell), la céruloplasmine (Broman-Uriel-Sankar). Dans le groupe des enzymes de condensation, la fumarase (Hayman et Alberty), l'énolase (Malmstrom). Enfin, dans celui des isomérases, la phosphohéxose isomérase (Nisselbaum, Schlamowitz et Bodanski).

Comme pour les hormones et l'hémoglobine, la phylogenèse, l'ontogenèse — la localisation tissulaire également — marquent leur empreinte sur les isozymes de ces divers enzymes. Cette empreinte peut se résumer en trois propositions :

1° *Les conditions techniques étant identiques, un même isozyme d'un enzyme donné a, quel que soit le tissu considéré, une mobilité électrophorétique propre pour chaque espèce.* Moore et Angeletti l'ont montré pour les phosphatases acides. Keck a même trouvé une différence de cet ordre pour deux algues unicellulaires voisines : *Acetabularia mediterranea* et *Acicularia Schenckii*. Augustinsson le met en évidence pour les différents types d'estérases du plasma des vertébrés. Paul et Fottrell retrouvent cette particularité des estérases et prouvent qu'il en est de même pour les phosphatases alcalines, les peroxydases et les catalases. De leur côté, Löwenthal, Van Sande et Karcher constatent que si les isozymes de la malicodéshydrogénase du sérum, du liquide céphalo-rachidien et des extraits cérébraux ont une disposition sensiblement identique chez l'homme et le mouton ; chez ce dernier, leurs mobilités électrophorétiques sont très différentes.

2° *Les conditions techniques étant identiques, un même isozyme d'un enzyme donné, étudié au niveau d'un même tissu, présente pour une même espèce des variations d'activité selon les stades de son ontogenèse.* Laufer en a donné récemment une très belle démonstration pour l' α -glycérophosphate et la malicodéshydrogénase chez deux insectes (*Hyalophora Cécropia* et *Samia Cynthia*). Certains isozymes peuvent apparaître et augmenter en activité ; d'autres peuvent disparaître. Il est d'ailleurs difficile d'apprécier si cette disparition d'activité implique une disparition de l'isozyme lui-même. Cet auteur insiste sur ce point et pense très justement que cette disparition apparente tient plutôt à une sensibilité insuffisante de la technique de mise en évidence. McCune fait la même démonstration pour les peroxydases dans les jeunes pousses de maïs. Gerhardt, Clausen et Andersen mettent en évidence cette particularité pour les estérases du cerveau humain chez l'adulte et l'embryon.

3° *Les conditions techniques étant identiques, un même isozyme d'un enzyme donné pour une même espèce présente une activité différente selon le tissu considéré.* Moore et Angeletti le prouvent pour deux enzymes du cycle des pentoses : la glucose 6-phosphate et l'acide 6-phosphogluconique déshydrogénase. Laufer pour les estérases.

Retrouvées chez les animaux, les végétaux et les êtres unicellulaires, ces trois propositions constatent des faits, mais ne les expliquent pas. Comme le remarquent très justement Moore et Angeletti, seule une étude précise physicochimique, cinétique en usant ou non de NAD-analogues, immunologique et génétique permettra d'entrevoir la raison et le mécanisme d'action des isozymes. Depuis cinq à six ans, la litté-

rature abonde de recherches de ce type et il s'avère difficile de faire le point, car chaque auteur expérimente sur un type particulier d'enzyme, et il n'est pas sûr que ce que l'on nomme actuellement « isozyme » possède des caractères généraux identiques pour tous les enzymes. Ainsi, au point de vue physicochimique, Kaji, Trayser et Colowick, travaillant sur l'hexokinase de la levure, obtiennent par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose six zones d'activité qu'ils nomment par les six premières lettres, le maximum d'activité se trouvant au niveau des pics b, e et f. En rapportant l'activité de chaque pic à leur concentration protéique propre, ils obtiennent une activité spécifique sensiblement identique pour chacun. Par ailleurs, Kaji, selon le mode d'élution, classe ces six pics en deux grandes fractions. La « fraction I », contenant les pics a et b, est obtenue par un gradient de pH. Les quatre autres, élus par un gradient croissant de NaCl, forment la « fraction II ». Ces deux fractions sont pour ainsi dire identiques au point de vue pH optimum, constante de Michaelis, sensibilité aux inhibiteurs et activité spécifique. Or, si l'on fait agir en présence de glucose sur la fraction I la trypsine ou la chymotrypsine dont on connaît le mode de scission des chaînes peptidiques, cette dernière se convertit en fraction II. Ceci signifie que dans la fraction I existait une partie de chaîne peptidique totalement inutile pour l'activité enzymatique, autrement dit que les sites actifs de la fraction I ont été mieux isolés. En plus que l'on peut voir là une démonstration du fait que les isozymes ne sont pas des artéfacts dus au mode opératoire comme le pensaient certains auteurs, cette conversion de la fraction I en fraction II semble apporter un argument à l'hypothèse génétique émise par Levinthal en 1960 dans sa discussion d'un rapport de Spiegelman sur les facteurs influençant la biosynthèse des protéines. Selon lui, l'isozyme serait une molécule composée de plusieurs polypeptides. Un polypeptide correspondant au site actif dépendrait d'un seul gène et serait identique pour tous les isozymes d'un enzyme donné. Un autre polypeptide, répondant à un gène différent selon les isozymes, régirait la spécificité d'attachement dans la cellule. Si cette hypothèse peut s'appliquer à certains types d'enzyme, Allen a montré pour les estérases chez un protozoaire (*Tetrahymena Pyriformis*) que, dans ce cas, le polypeptide portant le site actif et celui assurant la spécificité d'attachement dépendaient chacun d'un seul gène, et qu'il existerait un troisième polypeptide de rôle inconnu et répondant lui à un gène différent selon l'isozyme. D'ailleurs, pour ce même type d'enzyme, Paul et Fottrell rapportent un cas très démonstratif de disparition de deux isozymes dans des extraits de rein et de l'un des deux dans ceux de foie d'une souris

parmi un lot examiné de façon systématique. D'autres hypothèses ont été avancées qui chacune trouve des ébauches de preuves selon les cas considérés. Ainsi, un polypeptide unique, donc dépendant d'un seul gène, pourrait se polymériser à des degrés variables. Il s'ensuivrait des structures tertiaires différentes selon les isozymes d'où des modes d'attachement divers seraient possibles dans la cellule. Des études de Schwarz sur certaines aliestérases du maïs, il semblerait que chaque molécule est un dimère. Au contraire, Bach, Signer, Levinthal et Sizer ont montré qu'il était impossible que la phosphatase alcaline soit un polymère. La protéine serait unique et ne différerait selon les isozymes que par de légères modifications de la structure tertiaire. Dans la protéine native, la structure primaire imposant la tertiaire, on est forcé d'admettre que dans la cellule il peut exister de très légères et très peu nombreuses modifications de forme correspondant aux sites d'attachement. Pour Markert et Appella, il pourrait s'agir aussi d'amidation des carboxyles ou de conjugaisons avec des petites molécules étrangères. La nécessité de cette spécificité d'attachement intracellulaire découle de la théorie de Vogel qui, dès 1955, postulait qu'un enzyme s'adapte aux métabolismes particuliers de certaines zones du protoplasme cellulaire. La preuve en est donnée en quelque sorte par Stadtman, Cohen et Le Bras qui, au laboratoire d'enzymologie du CNRS de Gif-sur-Yvette, ont montré sur *E. Coli* que dans les trois voies de synthèse de la lysine, de la thréonine et de la méthionine, issues toutes trois de l'acide aspartique, il existait pour la lysine et la thréonine deux aspartokinases obéissant chacune à des mécanismes propres de rétro-inhibition et de répression enzymatiques. Parallèlement, l'immunochimie apporte dans l'ensemble des résultats très disparates. Ainsi, McGeachin et Reynolds ont rapporté que les amylases salivaires de l'homme et pancréatique du porc ont des propriétés antigéniques différentes de celles du foie, et que les anticorps formés ont des propriétés inhibitrices de l'amylase. Schlammowitz, de son côté, a montré pour les phosphatases que le complexe antigène-anticorps demeurerait actif. Ceci indiquerait donc que le site antigénique de l'amylase coïnciderait avec le site actif et que l'inhibition ne ferait que traduire son blocage ou son recouvrement par les anticorps.

De l'ensemble de ces faits, il ressort que l'on ne peut encore invoquer une théorie générale de l'isozyme. Il semble d'ailleurs qu'ultérieurement surviendra un démembrement de cette notion, les résultats précis mais différents obtenus pour certains enzymes — et en particulier pour la lactico-déshydrogénase — n'entraînant aucune possibilité de discussion ultérieure sur leur validité.

II. — Problème particulier des isozymes de la lactico-déshydrogénase

Tout d'abord, il convient de régler une fois pour toutes un point de terminologie. Contrairement à Plagemann, Gregory et Wroblewski et à certains chercheurs anglosaxons tels que Hill, Vesell, Hess, Allen qui emploient une notation inverse, la majorité des auteurs attribuent le chiffre « I » à l'isozyme le plus rapide électrophorétiquement et, successivement, les chiffres suivants aux autres isozymes selon leur degré décroissant de mobilité. Dans ce travail, nous utiliserons uniquement cette dernière notation.

Sans conteste, Wieland et Pfeleiderer ont été les premiers dès 1956 à s'intéresser de façon systématique aux propriétés physicochimiques et cinétiques des isozymes de la LDH. Ils ont travaillé essentiellement sur le rat, accessoirement sur d'autres animaux. Ils trouvent pour chaque isozyme obtenu très purifié le poids moléculaire de 130.000. L'établissement de la formule brute en acides aminés des quatre premiers isozymes du myocarde, du cinquième isozyme du muscle et du foie du rat leur permet de faire des constatations intéressantes :

1° Si les constitutions des isozymes du foie et du muscle sont sensiblement identiques, il n'en va pas de même pour ceux du myocarde (fig. 1 et 2). L'analyse des peptides obtenus par action de la trypsine sur ces derniers montre également des différences frappantes. Ceci infirme donc déjà l'hypothèse du gène unique dans la biosynthèse des isozymes.

2° Considérant pour chaque isozyme le nombre d'acides aminés basiques et acides et estimant à quatre-vingt-dix celui des groupements amides détruits par l'hydrolyse préalable avec HCl 6N, ils expliquent les différences de mobilité. Nous rapportons ci-dessous leur

TABLEAU II

	Myocarde				Muscle	Foie
	I	II	III	IV	V	V
Charges + (ARG + LYS)	120	123	128	137	138	138
Charges - (GLU + ASP)	241	237	233	230	223	225
Gr. amides	90	90	90	90	90	90
Différence	151	147	143	140	133	135
Différence de charges	-31	-24	-15	-3	+5	+3
Mobilités vers l'anode en unités arbitraires	100	75	50	25	0	0

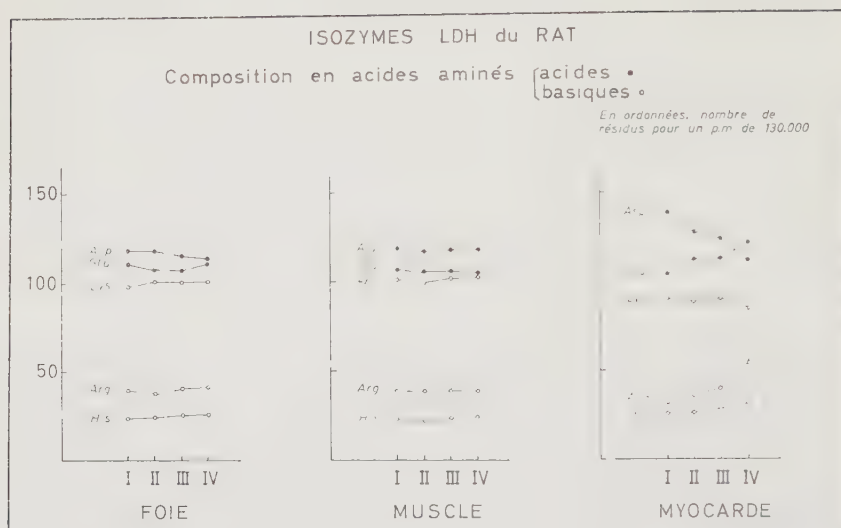


FIG. 1.

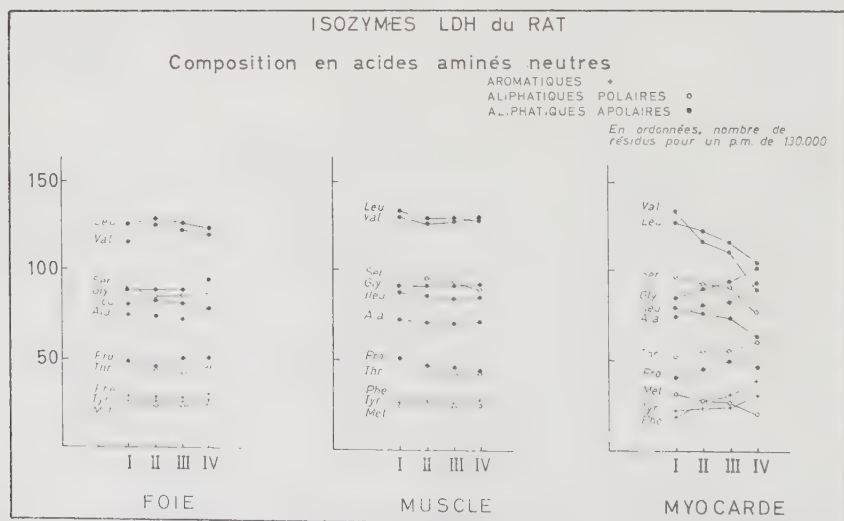


FIG. 2.

tableau où ils ne tiennent pas compte des résidus d'histidine, puisqu'au pH de l'électrophorèse (pH 8,6), ces derniers sont proches de leur point isoélectrique (tabl. II).

3° Comparant également le myocarde du rat et celui du porc, ils trouvent une grande similitude dans les structures primaires des isozymes qui ne diffèrent, en fait, que par leur teneur en acides aspartique et glutamique. Au contraire, celle des muscles du rat et du lapin n'ont aucune ressemblance.

De leur côté, Markert et Appela trouvent pour le myocarde et le muscle de bœuf des poids moléculaire de 134 et 140.000, pour le myocarde de porc de 132.000. Pour ces deux espèces, lorsqu'ils font agir une solution d'urée 12 M sur la LDH purifiée, ils obtiennent quatre sous-unités, de poids moléculaire identique — sensiblement le quart de celui de la molécule entière — et presque identiques au point de vue acides aminés N et C terminaux et compositions peptidiques après action de la trypsine. Ne présentant aucune activité enzymatique, ces quatre sous-unités migrent à l'électrophorèse en deux bandes distinctes, ce qui sous-entend des différences de charges. Appelant ces deux variétés de polypeptides A et B et raisonnant par analogie avec la structure de l'hémoglobine dont la fraction globine est formée de deux chaînes α et de deux chaînes β , Markert émet l'hypothèse que chaque isozyme est composé de quatre chaînes peptidiques de la façon suivante : (tabl. III).

TABLEAU III

Numéro des isozymes	Nombre de polypeptides		Symboles
	A	B	
I	0	4	A_0B_4
II	1	3	A_1B_3
III	2	2	A_2B_2
IV	3	1	A_3B_1
V	4	0	A_4B_0

Cette conception implique donc l'intervention de deux gènes, l'un assurant la biosynthèse de A, l'autre B. Cahn, Kaplan, Levine et Zwilling adoptent cette hypothèse et nommant les deux polypeptides « H » (type myocarde) et « M » (type muscle) en arrivent à deux types parentaux « HHHH » et « MMMM » et trois formes hybrides « HHHM », « HHMM » et « HMMM ».

Si Hill et Meacham constatent après une, trois et cinq semaines de stockage à 4°C de grandes variations de stabilities des divers iso-

zymes obtenus purs à partir du sérum humain, ils estiment que leur stabilité à la chaleur est renforcée par l'addition d'albumine. Wroblewski et Gregory vérifient ces faits. De plus, à 53° C, ils constatent une diminution d'activité qui se ferait après un temps de latence selon une réaction du premier ordre pour les quatre derniers isozymes. Selon eux, on pourrait dire que les logarithmes des constantes de vitesse d'inactivation sont inversement proportionnels aux mobilités électrophorétiques des isozymes. Si Löwenthal, Van Sande et Karcher ne retrouvent pas ce fait pour le cerveau du rat, leur expérimentation sur les extraits cérébraux humains le confirme entièrement. A 58,5° C, ils constatent en effet la disparition des quatrième et cinquième isozymes après dix minutes et après quarante-cinq minutes celle du troisième. Plus tardivement, le deuxième isozyme peut disparaître, tandis que le premier résiste plus longtemps. Le fait, confirmé par certains auteurs lors du dernier symposium de Gand, que les isozymes du cerveau du rat n'obéissent pas à cette loi vient peut-être de la différence de structure primaire, constatée par Wieland et Pfeleiderer, pour les isozymes du rat et du lapin. Nous rappelons que Plagemann, Wroblewski et Gregory ont établi cette loi de thermosensibilité en expérimentant sur le lapin. Par ailleurs, Wroblewski et Gregory ont noté pour le premier isozyme sérique un fait très particulier. Lorsqu'ils ajoutent du NADH^2 , sa stabilité est plus renforcée que celle des autres isozymes. Ceci, selon eux, semblerait indiquer qu'il est composé de deux fractions différant par leur thermosensibilité.

Etudiant également les énergies d'activation apparentes pour la transformation du lactate en pyruvate par les cinq isozymes, ces auteurs démontrent que pour un excès de lactate et de NADH^2 leurs logarithmes sont proportionnels aux mobilités électrophorétiques. Si pour le calcul des énergies d'activation la concentration en lactate importe peu lors de l'oxydation du lactate en pyruvate, il n'en va pas de même lorsque l'on considère la réaction inverse. Une concentration trop forte en pyruvate peut avoir une action inhibitrice. Cette concentration optimum dépend du pH et de la température. Plus ces derniers seront bas, plus son taux sera moindre. Pour un pH et une température donnée, Wroblewski et Gregory constatent — et Hill et Meacham le confirment — que plus la mobilité de l'isozyme est grande, plus basses sont sa constante de Michaelis et sa concentration optimum en pyruvate. Approximativement, le logarithme de cette dernière varie en raison inverse de la mobilité électrophorétique. En fait, cette raison inverse s'applique au logarithme du rapport des vitesses de réaction constatées pour des concentrations en pyruvate de 0,0025 M à pH 7,0 et de 0,0006 M à pH 8,0, représentant res-

pectivement les conditions optimums d'activité pour les cinquième et premier isozymes. Pour un même isozyme, Wieland et Pfeleiderer trouvent de très légères différences de concentrations optimums en pyruvate selon la localisation ($6, 9$ et $10 \cdot 10^{-7}$ M pour le premier isozyme du myocarde, du rein et du cerveau du rat). De son côté, Vesell, comme Wroblewski, constate que, si le pH optimum d'activité des cinq isozymes oscille entre 7,8 et 8,2, les constantes de Michaelis sont très différentes : 1,0 à $2,0 \cdot 10^{-5}$ moles pour les trois premiers et respectivement 5,6 et $4,2 \cdot 10^{-5}$ moles pour les quatrième et cinquième. Ces résultats suggèrent que ces deux derniers ont des sites actifs différents des trois autres. Utilisant des analogues du NAD (déaminoNAD et 3-acétylpyridineNAD), cet auteur trouve comme rapport d'activité LDH avec ces deux analogues les valeurs de 3 ± 1 pour le cinquième isozyme et 14 ± 2 pour le premier et le second. Ceci rejoint la ligne générale des recherches de Kaplan et son école sur les déshydrogénases avec les analogues du NAD. De leur côté, Bonavita et Guarnieri ont étudié l'action inhibitrice du métabisulfite de sodium. A la concentration de $1,66 \cdot 10^{-4}$ M, ce corps a une action très nette sur l'activité des isozymes les plus lents. Nommant ces derniers par les lettres de l'alphabet dans le sens de la migration (A,B cathodiques, C,D,E anodiques), ils obtiennent en effet le tableau IV :

TABLEAU IV

	Inhibition (%)
LDH native.	80
Isozyme A	70
Isozyme B	58,8
Isozyme C	40

Dans les mêmes conditions opératoires, mais en faisant varier le pH, ils notent également peu de modifications pour A et B en comparaison de celles présentées par l'activité de C.

Cette opposition entre premiers et derniers isozymes se retrouve encore dans le domaine de l'immunologie. Plagemann, Gregory et Wroblewski montrent que l'anticorps anticinquième isozyme inhibe à un taux identique les quatrième et cinquième isozymes et les trois autres à des taux inversement proportionnels à leur mobilité électrophorétique. En revanche, l'anticorps antipremier isozyme a une action rigoureusement inverse avec le même taux d'inhibition pour les quatrième et cinquième isozymes. Autrement dit, la concentration en anticorps importe dans ce phénomène, car une solution à faible con-

centration en anticorps anticinquième isozyme et une solution à forte concentration en anticorps antipremier isozyme peuvent inhiber à un même degré les quatrième et cinquième isozymes.

De l'ensemble de ces faits, il semble qu'à l'heure actuelle on puisse conclure que : 1^o les isozymes ont chacun un poids moléculaire identique à celui de la LDH obtenue cristallisée par la méthode de Straub ; 2^o leur structure primaire différente explique leur différence de mobilité et présuppose le contrôle polygénique de leur biosynthèse, que l'hypothèse de Markert se vérifie ou non ; 3^o leurs propriétés cinétiques et immunologique permettent, par contre, de les subdiviser en deux groupes (dans l'un les trois premiers, les deux derniers dans l'autre), la différence résidant vraisemblablement dans la structure du site actif. Pflaederer et Wachsmuth voient là une adaptation au type métabolique tissulaire, le cinquième isozyme étant prédominant dans les tissus à métabolisme strictement anaérobie et le premier dans ceux à forte consommation en oxygène.

Quoi qu'il en soit, en gel d'amidon (tampon borate), Allen trouve pour les extraits tissulaires de souris un chiffre maximum, rarement atteint d'ailleurs, de huit et même neuf zones actives au point de vue enzymatique. Il les numérote à partir de la fente de départ et attribue respectivement les lettres A aux sept se trouvant dans la direction de l'anode et C aux deux dernières bien entendu dans la direction de la cathode. Dans ces conditions, en utilisant le deamino-NAD, cet auteur retrouve en amidon une hétérogénéité d'activité du même type qu'en agar. Les bandes A 6 et A 7 sont légèrement inhibées, à un degré plus important A 1 et C 1 et presque complètement A 2, A 3, A 4 et A 5. Au contraire, la bande C 2 est très augmentée en activité (presque trois fois plus qu'avec NAD). Plus importants s'avèrent ses résultats lorsqu'il utilise des substrats différents. Comme l'on pouvait s'y attendre toutes les bandes oxydent l'acide (l) lactique mais à des degrés divers (tabl. V p. 000) : surtout les bandes A 1, A 6 et A 7, presque autant la bande C 1, ensuite les bandes A 2, A 4 et A 5, enfin les bandes C 2 et A 3. Les bandes A 6 et A 7 présentent seules une légère activité pour l'acide (d) lactique. A l'exception de la bande C 2, l'acide (dl) α -hydroxybutyrique déprime ou abolit l'activité de toutes les autres. L'acide (dl) α -hydroxyvalérique abolit l'activité de toutes les bandes exceptées la bande C 2. Il en est de même pour les acides (dl) α -hydroxyisovalérique, α -hydroxycaproïque, β -phényllactique et α -hydroxyisobutyrique. Toutefois, le premier inhibe un peu la bande C 2, les deux suivants un peu plus et le dernier complètement. Allant plus loin dans ses investigations, Allen trouve dans les extraits de glandes mammaires le maximum

d'activité dans les bandes A les plus rapides pour les animaux en lactation et dans les bandes les moins rapides pour les animaux ovariectomisés. L'action hormonale avec son corollaire métabolique ne fait ici aucun doute. De même, les électrophorèses d'extraits de canal épидидymaire d'animaux après castration ou section des *vasa efferentia* présentent uniquement une absence complète d'activité de la bande C 2. Reprenant ce travail au point de vue histochimique, Allen et Slater montrent qu'après incubation des coupes de canal épидидymaire dans l'acide (1) lactique, il existe une activité enzymatique très forte à l'apex et beaucoup plus diffuse dans le reste du protoplasme des cellules épithéliales bordantes. En utilisant les autres substrats (α -hydroxybutyrique, valérique, caproïque), une activité aussi intense se retrouve uniquement au niveau de l'apex. Pour les animaux ayant subi une section des *vasa efferentia*, il n'y a plus d'activité apicale quel que soit le substrat. Tout au plus, l'acide (1) lactique extérieuse-t-il une activité diffuse du cytoplasme. Il semble donc que l'on puisse admettre, du moins dans ce type de cellules, que l'isozyme C² est localisé à l'apex. En exceptant le fait que Nage, Suyama et Smith ont isolé sérologiquement quatre LDH distinctes dans différentes régions de l'oocyte de grenouille, c'est le seul exemple évident de localisation intracellulaire d'un isozyme que l'on possède à ce jour. En passant, nous rappelons que récemment Vesell a localisé — sans preuves entièrement convaincantes d'ailleurs — l'un de ces derniers au noyau des érythrocytes de certaines espèces. L'exemple d'Allen infirme la théorie primitive qui voyait dans chaque isozyme un témoin d'un type cellulaire du tissu considéré. D'ailleurs, Tsao a mis en évidence une hétérogénéité LDH dans les cultures de fibroblastes. Tout en sachant ce que cela peut avoir d'aventureux, il semble que l'on peut avancer qu'il existe une ultraspécialisation de chaque isozyme pour un secteur du protoplasme qui lui est propre. Ce n'est pas l'avis de tous. Entre autres de Van Sande qui dans sa thèse émet l'hypothèse que les isozymes sont la résultante d'un équilibre dynamique entre l'anabolisme et le catabolisme protéique. L'action des cathepsines entraînerait progressivement l'apparition de protéines enzymatique hétérogènes.

En face de cet aspect, encore fortement marqué par les hypothèses, de nos connaissances sur la structure et le mode d'action des isozymes de la LDH, le rôle que jouent le phylogénèse, l'ontogénèse, la localisation et même la pathologie sur leur disposition est beaucoup plus tangible. Déjà, Markert et Møller notaient une différence dans les isozymes du myocarde de porc, de bœuf, de mouton, de lapin et de souris, mais faute de corps de référence n'apportaient pas de résultats numériques sur les différences de migration. Pfeleiderer, Jeckel et

Wieland donnent les premiers chiffres pour le premier isozyme du myocarde de rat, de bœuf et de porc. Que l'on utilise comme référence l'hémoglobine bovine pure selon la technique de Smithies, comme le fait Wroblewski ou un mélange de dextran, de sidérophiline et d'albumine humaines comme Wieme, ainsi que nous le verrons plus loin, les données sont beaucoup plus précises. Ainsi, Löwenthal, Van Sande et Karcher ont montré que chez l'homme chaque isozyme a une mobilité identique que l'on considère le sérum, les extraits cérébraux et le liquide céphalo-rachidien où ils ont été les premiers à décrire cette activité. C'est une propriété de l'espèce qu'il retrouve chez le mouton. Au Symposium Neurochimique de St Wolfgang, ces mêmes auteurs et nous-mêmes avons rapportés les données obtenues par une exploration plus complète des espèces animales. Le fait important à retenir, outre la grande diversité des mobilités observées, est que la disposition des isozymes la plus proche de l'homme est celle des grands singes anthropoïdes. Parallèlement, travaillant sur les extraits tissulaires d'un embryon de porc de 12 cm et comparant avec les extraits tissulaires de même localisation pour un porc adulte, Markert et Møller mettent en évidence de grandes variations d'activité pour chaque isozyme en gel d'amidon (tabl. VI).

TABLEAU VI

		MYOCARDE		MUSCLE	
		Adulte	Embryon	Adulte	Embryon
Anode	I	+++++	++++	+++++	+
	II	+++	+++++	+++	+
	III		+		
	IV	+	+++++	++++	++
	V				
Cathode	Fente				
	VI			+++	
		FOIE		REIN	
		Adulte	Embryon	Adulte	Embryon
Anode	I	++++	++++	++++	++
	II	++	+++++	+++++	++++
	III		+		+
	IV	+	+++	++	++
	V			+	+
Cathode	Fente				
	VI				

Reprenant ces recherches sur le rein de la souris, Markert note que l'activité est la plus importante dans les isozymes lents à la nais-

sance et que cette prédominance apparaît pour les isozymes rapides, dès le troisième jour, prédominance allant en augmentant jusqu'à l'âge adulte. Appliquant son hypothèse, il explique ces faits en supposant une hyperactivité du gène assurant la biosynthèse du polypeptide A à la naissance. Secondairement, ce gène perdrait de son activité au profit de celui gouvernant la biosynthèse du polypeptide B. Flexner, Flexner, Roberts et De La Haba trouvent des variations du même type dans le cortex et le foie au cours du développement de la souris et du cobaye et, selon eux, le nombre des isozymes diminuerait avec le temps dans le foie. De son côté, Bonavita estime que, con-

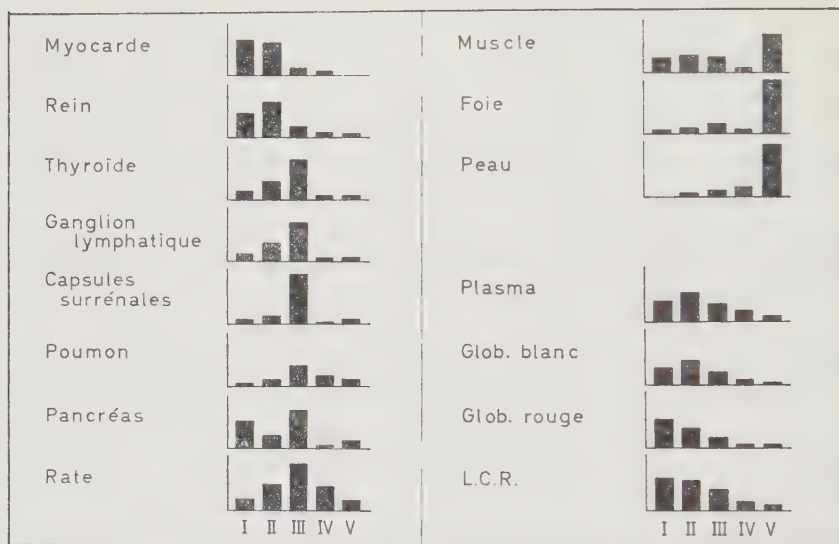


FIG. 3.

trairement à l'adulte, dans le cerveau du rat lors des premiers jours après la naissance, ce sont les trois derniers isozymes qui présentent l'activité la plus forte, la disposition « adulte » avec prédominance des premiers étant atteinte dès le cinquantième jour. De leur côté, Gerhardt, Clausen et Andersen trouvent une hyperactivité des troisième et quatrième isozymes dans les extraits cérébraux de fœtus et de nouveau-né humains. Mais, sans conteste, c'est l'aspect général de l'enzymogramme — le « pattern » pour les anglo-saxons — selon la localisation qui a le plus intéressé les auteurs. Se sont plus particulièrement penchés sur cette question : Markert et Möller-Wieland et Pfeleiderer-Vesell et Bearn-Wieme-Löwenthal, Van Sande et Karcher-Wroblewski. Ainsi, pour le myocarde, le globule rouge, le liquide céphalo-rachidien, le premier isozyme, du moins chez l'homme, aura

l'activité la plus forte. Ce sera le second pour le rein, le sérum, le leucocyte. Le troisième dans la thyroïde, le ganglion lymphatique, la capsule surrénale, le poumon, le pancréas, la rate. Enfin, le cinquième pour le muscle, le foie, le derme et l'épiderme. De cette énumération, il ressort que le quatrième isozyme n'a jamais d'activité prépondérante. En fait, ce n'est pas uniquement l'isozyme ayant la primauté d'activité qui importe. Il faut tenir compte des proportions des quatre autres par rapport à ce dernier (fig. 3). Ces résultats, statistiquement toujours identiques, ont permis à Wroblewski de poser comme règle que *chaque tissu, dans une espèce donnée, avait une disposition de ses isozymes de la LDH qui lui était propre, et que cette règle ne souffrait pas d'exceptions dans l'organisme*. La vérification de cette règle au niveau du système nerveux humain et animal sera, en fait, l'un des objectifs de notre travail. Quoi qu'il en soit, la pathologie, dans certains cas, entraîne un bouleversement de l'enzymogramme. C'est essentiellement le sérum qui a fait l'objet des investigations. La première démonstration en a été fournie dans les cas d'infarctus du myocarde pour lesquels le premier isozyme est augmenté le premier jour — parfois dès la première heure — à un taux beaucoup plus élevé que le second. Par ailleurs, Wieme a bien décrit que l'hyperactivité du cinquième isozyme était, du moins au début, le témoin d'une nécrose aiguë hépatique qu'elle soit de cause toxique ou autre. D'autres bouleversements moins constants ont été décrits pour la pancréatite hémorragique (Vesell), le cancer, les divers types d'anémie, les leucémies (Wroblewski et Gregory). Enfin, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, l'hémoconcentration du choc hémorragique se traduit par une hyperactivité de tous les isozymes du sérum (Vesell).

III. — Conclusions

C'est à dessein que nous nous sommes volontairement étendus sur les multiples aspects que peut prendre la mise en évidence des isozymes de la LDH, tant dans le domaine de la recherche pure que dans celui de l'application clinique. Nous avons pensé que c'était la meilleure façon d'introduire le problème de l'activité isozymique dans le système nerveux. Il est très vraisemblable, en effet, que dans l'avenir la solution de ce problème, encore peu exploré, apportera une meilleure compréhension du métabolisme de la cellule nerveuse et aidera peut être à l'édification d'une pathologie moléculaire cérébrale.

CHAPITRE III

Techniques

I. — Que met-on exactement en évidence par les techniques employées ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la LDH est maintenant assez bien caractérisée. Dans leurs études sur la localisation intracellulaire des systèmes enzymatiques, Dounce, Holter, Claude, De Duve et Berthet, Schneider estiment que l'activité maximum de la LDH se trouve dans le surnageant après centrifugation différentielle des éléments cellulaires. Plus récemment, Dixon et Webb affirment qu'elle n'existerait que dans le surnageant. En fait selon Johnson, la répartition dans les organites cellulaires du système nerveux serait la suivante, en estimant à 7 % les pertes dues aux diverses manipulations (tabl. VII) :

TABLEAU VII

	Activités LDH (%)
Noyau	3
Mitochondries	22
Microsomes.	5
Surnageant	70

Bien que discipline très jeune, la neurochimie a déjà vu d'assez nombreuses études sur la répartition topographique des éléments minéraux dans le tissu nerveux (Timm, Löwenthal, Butt, Thompson, Cumings). Ces déterminations ont été réalisées sur le tissu « total ». Malheureusement, nos connaissances sur les taux des métaux dans les extraits cérébraux sont beaucoup plus restreintes. Cela tient à l'extrême sensibilité que doivent présenter les méthodes employées et aussi au volume parfois minime de certaines localisations. Tout en sachant ce que cela peut avoir de fragmentaire, nous signalons qu'il a été décrit un certain nombre de métalloprotéines et métallo-

enzymes solubles dans le système nerveux : liés au fer, la sidérophiline, la ferritine et nécessairement l'hémoglobine que l'on ne peut jamais séparer complètement des extraits, liés au cuivre, la cuproprotéine soluble de Porter et Folch, la tyrosimane et peut-être la céruloplasmine, liée au magnésium, l'énolase, liées au zinc, la lacticodéshydrogénase et l'anhydrase carbonique, enfin, liés à un métalloïde, le phosphore, une phosphoprotéine soluble, tous les dérivés phosphorés à liaison riche en énergie participant à la glycolyse et leurs systèmes enzymatiques (Dixon et Webb).

Tout aussi succinctes sont nos connaissances sur les protéines hydrosolubles. McIlwain avance le taux de 80 mg de protéines totales, donc solubles et insolubles, par gramme de tissu frais. Le Baron et Folch, de leur côté, donnent un chiffre oscillant entre 60 et 120 mg, et de plus démontrent que pour des forces ioniques de 2 à 3 et des pH de 6,0 à 9,0, on peut extraire au maximum 47 % des protéines pour les structures grises et 21 % pour la substance blanche, soit respectivement de 28 à 56 mg et de 12 à 24 mg par gramme de tissu frais. Dans une étude plus récente, Palladin, en dosant les taux de protéines dans les divers éléments cellulaires nerveux obtenus par centrifugation différentielle, trouve les pourcentages suivants : noyaux=7,5 mitochondries=23,3 ; microsomes=1,9 et surtout surnageant=22,0 ; liquides de lavage=42,5. Personnellement, avec la technique adoptée, nous avons par gramme de tissu frais, ainsi que nous le retrouverons plus loin, une moyenne de 17,4 mg pour la substance blanche, de 18,0 mg pour le cortex hémisphérique, de 21,4 mg pour les structures grises profondes et de 45,0 mg pour le cortex cérébelleux.

Quoi qu'il en soit, nous allons maintenant exposer les diverses techniques utilisées. Dans un premier sous-chapitre, l'extraction et les dosages des protéines totales et de l'activité lactidéshydrogénasique totale. Ensuite, la microélectrophorèse en agar des protéines et l'enzymoélectrophorèse en agar. Dans un troisième sous-chapitre, le dosage des éléments minéraux dans le tissu nerveux et ses extraits. Enfin, pour terminer, nous mentionnerons les principales méthodes statistiques employées.

II. — Les techniques proprement dites

1. Extraction et dosages des protéines hydrosolubles totales et de l'activité lactico-déshydrogénasique totale.

A. Extraction.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, Le Baron et Folch, en 1959, ont défini les conditions de température, d'homogénéisation, de cen-

trifugation ainsi que la composition et le volume du solvant nécessaire pour que l'extraction soit faite dans les conditions optimums. Auparavant, Tonini et Missere avaient discuté de la force ionique du solvant et, si Robuschi et Benassi proposaient l'eau pour ce dernier, Caravaglios et Chiaverini préféraient une solution isotonique de saccharose 0,25 M. De leur côté, Cuha utilise un tampon borate et Dingman un tampon glycine à pH 9,5.

Personnellement, nous suivons le mode opératoire suivant. Un fragment de tissu cérébral, après avoir été pesé, est mis dans un tube à centrifuger. On lui ajoute la moitié de son poids en volume de la solution isotonique de saccharose (0,25 M), autrement dit pour un gramme de tissu, 0,5 ml de solution. Si l'on suspecte que le fragment est très riche en protéines, on lui ajoute un volume égal à son poids,

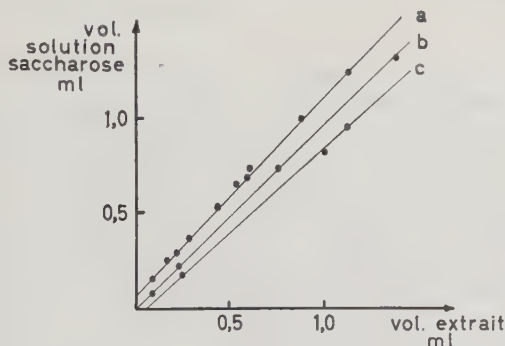


FIG. 4.

soit 1 ml de solution pour un gramme de tissu. Ensuite, on homogénéise à l'aide d'une baguette de verre. Cette manipulation est faite à 0° C, ainsi que la centrifugation (16.000 g pendant trente minutes). Enfin, on recueille le surnageant et on l'utilise tel quel ou on le garde à 0° C. Dans ces conditions, le volume d'extrait recueilli par rapport à celui de la solution de saccharose ajoutée varie selon la localisation (fig. 4). Pour le pallidum, la moelle, l'axe gris médullaire, il y a concordance (cf. b). Pour le noyau caudé, le cortex hémisphérique et les cordons médullaires, le volume de l'extrait est plus important (cf. c). A l'opposé, pour le centre ovale, la substance blanche périventriculaire, la corne d'Ammon et le putamen, on recueille un volume moindre (cf. a). Il est donc évident que, pour avoir proportionnellement moins de perte, il faut utiliser des poids de tissu frais plus importants. Tout aussi évidente, d'ailleurs, est la propriété de rétention liquidienne des structures blanches.

Pour l'extraction en vue d'étude d'enzymatique, nous procédons

sensiblement de la même façon. Le seul point différent est que nous ajoutons le double du poids en volume de la solution de saccharose 0,25 M, soit 2 ml de solution pour un gramme de tissu. Le choix de ce mode opératoire repose sur des données précises et s'est révélé être le seul possible. Si l'on utilise l'extrait préparé selon le premier mode, l'activité enzymatique sera très forte par unité de volume et il s'ensuivra de grandes difficultés pour une réalisation correcte de l'enzymoélectrophorèse. Le deuxième mode permet d'obtenir une activité de 1.000 à 2.000 unités Bücher par ml d'extrait et surtout donne la certitude d'une enzymoélectrophorèse facile et significative. Wieme avec d'autres auteurs a apporté la preuve que c'était la seule façon d'opérer en faisant des enzymoélectrophorèses sur diverses dilutions d'un extrait musculaire (1 g/2 ml solution tampon, 20.000 g pendant dix minutes). En exprimant en unités arbitraires la surface des pics des isozymes, il obtient ces résultats (tabl. VIII) :

TABLEAU VIII

Isozymes	Extrait musculaire	DILUTIONS				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
I	5.700	2.100	800	500	Traces	—
II	15.000	8.200	3.700	2.200	1.100	700
III	26.400	22.600	15.700	11.500	7.000	3.800
IV	36.400	34.200	27.500	23.500	18.000	13.800
V	51.700	50.700	42.300	36.600	30.600	23.400

Van Sande, en procédant selon ces conditions pour l'extraction, a montré qu'il existait un rapport linéaire entre l'activité enzymatique totale et le poids du fragment de tissu frais utilisé. Il obtient une pente pour le cortex hémisphérique plus marquée que celle pour les structures blanches et rejoint ainsi nos résultats sur l'extraction en vue du dosage des protéines.

B. Dosage des protéines solubles totales.

Après précipitation par l'acide trichloracétique, les protéines des extraits cérébraux sont reprises en milieu alcalin, et l'on applique ensuite la méthode classique du biuret. Les lectures sont faites à 540 m μ et les résultats comparés à une courbe étalon établie grâce à un sérum humain dont on connaissait le taux global de protéines.

C. Dosage de l'activité lacticodéshydrogénasique totale.

L'unité d'activité la plus communément employée en Europe est celle de Bücher. Pour une cuvette de 1 cm d'épaisseur, une longueur d'onde de 366 m μ et une température de 25° C, Bücher définit ainsi cette

unité : la quantité de LDH devant exister dans 1 ml d'extrait pour qu'il y ait, en cent secondes, une modification de 0,1 de l'extinction du NADH^2 contenu dans un volume de 2,3 ml. L'unité de Bücher correspond à 1,093 unité internationale, cette dernière étant la quantité de LDH qui, dans les mêmes conditions opératoires (longueur d'onde, température et épaisseur de cuvette), transforme une micromole de substrat en une heure.

1. Matériel nécessaire :

- a) Solution tampon véronal (pH 8,4 — $\mu=0,05$).
- b) Solution de pyruvate de Na 0,01 M.
- c) Solution de NADH^2 (1,6 mg/ml).
- d) Extrait cérébral (1 gramme de tissu/2 ml solution saccharose 0,25 M).
- e) Photomètre et cuvette de 1 cm.

2. Technique proprement dite :

Premier temps : dans la cuvette, on met successivement : 1,2 ml de la solution tampon véronal ; 1,0 ml de la solution de pyruvate ; 0,1 ml de la solution de NADH^2 ; 0,05 ml d'extrait.

Deuxième temps : on lit au photomètre la variation d'extinction de minute en minute pendant cinq minutes en ne tenant compte que des extinctions inférieures à 2/100 de degré. On fait ensuite la moyenne de ces cinq mesures. Au cas où l'on a obtenu des extinctions supérieures à 2/100, on recommence l'opération avec des dilutions différentes jusqu'au moment où l'on se trouve dans les conditions requises.

3. Calcul des résultats.

On a obtenu ainsi la variation ΔE en 60 secondes. Pour être dans les conditions voulues par Bücher, on doit appliquer la formule suivante :

$$\text{activité LDH (un. Bücher/ml extrait)} = \frac{\Delta E}{0,1} \cdot \frac{100}{60} \cdot \frac{2,3}{0,05} \cdot \text{dilution}$$

Ce qui peut s'écrire plus simplement :

$$\text{activité LDH (un. Bücher/ml extrait)} = \Delta E \cdot 766,6 \cdot \text{dilution.}$$

Le chiffre obtenu donne l'activité enzymatique par ml d'extrait. Pour l'exprimer par rapport à un gramme de tissu frais, il suffit de multiplier par deux le chiffre précédent. Pour obtenir un résultat absolument exact, il faudrait tenir compte ici, comme nous l'avons vu plus haut, du coefficient de gain ou de perte de volume de l'extrait par rapport à celui de la solution de saccharose utilisée pour l'extraction.

2. Microélectrophorèse en agar des protéines et enzymoélectrophorèse en agar.

Dans sa thèse d'agrégation, Wieme a décrit de façon très détaillée la technique de microélectrophorèse en agar. Nous ne ferons ici que rappeler l'essentiel de cette dernière.

A. Matériel nécessaire :

1. Agar très purifié (Difco Spécial Agar Noble).
2. Solution stock tampon veronal (pH 8,4 — $\mu=0,1$) : Veronal 8,5 g ; HCl N 11,5 ml ; Eau distillée qsp 500 ml.

3. Solutions diverses :

a) Solution de référence ASM :

Albumine humaine (Behringwerke)	10 mg
Sidérophiline (Behringwerke)	10 mg
Macrodex (Dextran dépolymérisé. Poviet. Amsterdam)	0,10 ml
Eau distillée ou tampon veronal ($\mu=0,05$).	1,0 ml

Utilisée pour la mesure des mobilités relatives.

Sera conservée à 4°C.

b) Solution de fixation :

Ethanol	70 ml
Acide acétique	5 ml
Eau distillée qsp.	100 ml

4. Solutions spécialement utilisées dans la microélectrophorèse des protéines.

a) Solution de coloration :

Amido Schwarz (Amido Black 10 B Bayer).	0,5 g
HgCl ²	5,0 g
Acide acétique	5 ml
Eau distillée qsp.	100 ml

Sera filtré avant usage.

b) Solution de différenciation :

Acide acétique	2 ml
Eau distillée qsp	100 ml

5. Solutions spécialement utilisées dans l'enzymoélectrophorèse.

a) Solution de lactate/NaCN/NitroBT :

Solution de lactate de Na à 71 %	1,0 ml
NaCN	50 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,8690 g
KH ₂ PO ₄	0,2722 g

Nitro-BT (Sigma, St Louis, Miss. U.S.A.)	25 mg
Eau distillée qsp	90 ml

Peut être gardée plusieurs jours à l'obscurité.

b) Solution aqueuse à 0,1 % de Phenazine Méthosulfate (NBC, Cleveland, Ohio, U.S.A.).

Phenazine Méthosulfate	10 mg
Eau distillée	10 ml

Peut être gardée plusieurs jours à l'obscurité.

c) Solution aqueuse à 3 % de NAD (Boehringer) :

NAD	60 mg
Eau distillée	2 ml

Peut être gardée plusieurs jours à 4°C.

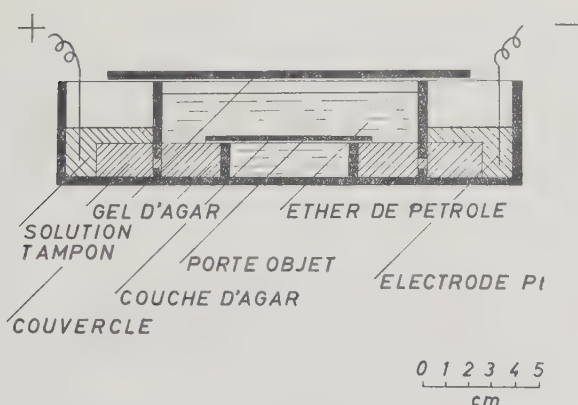


FIG. 5.

6. Cuve à électrophorèse, type Wieme :

C'est une cuve en matière plastique, divisée en trois compartiments par deux refents verticaux ne descendant pas jusqu'au fond de la cuve. Les deux compartiments latéraux sont réservés aux électrodes. Le compartiment central est subdivisé également par deux refents, parallèles aux précédents, séparés par 6 cm et s'élevant au tiers de la hauteur de la cuve (fig. 5).

7. Redresseur de courant.

Avec un redresseur de type courant, il est facile d'obtenir une différence de potentiel entre les deux électrodes de 140 volts pour une intensité de 10 à 15 mA.

8. Appareillage photométrique.

L'Analytrol (Spinco, USA) permet un enregistrement automatique de la courbe d'absorption et simultanément celui de la surface limitée

par cette dernière et la ligne de base. La lecture se fait pour la microélectrophorèse des protéines à 650 m μ . et pour l'enzymoélectrophorèse à 549 m μ .

9. Agrandisseur photographique.

Bien que pouvant paraître accessoire, cet appareillage est d'une grande utilité. Il permet de projeter l'image de l'électrophorèse sur la courbe obtenue, de repérer ainsi exactement la position de l'ASM, les limites des isozymes et des fractions protéiques. Ainsi que nous le verrons plus loin, il aide grandement au dépouillement des résultats.

B. Préparation du gel et ses applications.

Dans un Erlenmeyer de 500 ml, on met 50 ml de la solution stock de tampon véronal (pH 8,4 — $\mu=0,1$) et 50 ml d'eau distillée. La force ionique passe donc à 0,05. Cet Erlenmeyer, dont l'embouchure est recouverte afin de réduire au maximum l'évaporation par une fiole de 50 ml, est placé dans un bain-marie bouillant. Après cinq minutes, on ajoute 1 g d'agar et on continue à chauffer en remuant de temps en temps jusqu'à ce que la solution soit parfaitement claire. En général, il faut pour cela une vingtaine de minutes. En fait, on poursuit le chauffage pendant une heure.

1. Lames d'agar pour électrophorèse.

Sorti du bain-marie, l'Erlenmeyer est passé sous un courant d'eau froide. Lorsque sa température atteint 50°C, on verse une partie de son contenu dans le fond d'une boîte de Petri de 14 cm de diamètre. Pendant toutes les opérations suivantes, la boîte de Petri ne doit pas être changée de place. La gélification terminée, la surface du gel sera rigoureusement horizontale. On place sur cette dernière des lames de verre type microscopique (7,5 cm $\times$ 2,5 cm) et l'on verse sur l'ensemble 35 ml de la solution d'agar de l'Erlenmeyer. Une fois la gélification réalisée, on recouvre la boîte de petri d'une plaque de verre. On obtient de la sorte neuf à dix couches d'agar ayant sensiblement une épaisseur de 1 mm et qu'il sera facile de prélever grâce à un bistouri en suivant les bords les lames. Ces dernières, sans le secours d'un antifongique, peuvent être utilisées pendant trois à quatre jours.

2. Préparation de la cuve à électrophorèse.

Cent cinquante millilitres de la solution d'agar est préparée comme il a été indiqué plus haut (1 g/100 ml). On la verse dans chacun des compartiments latéraux jusqu'à ce qu'elle dépasse très légèrement les deux petits refents du compartiment central. La gélification obtenue, on découpe au bistouri et on enlève la moitié externe de la couche

d'agar des compartiments latéraux. A la surface des couches d'agar du compartiment central, on ajoute deux minces lamelles d'agar de 0,5 cm d'épaisseur. Pour que la cuve soit prête à fonctionner, il ne suffit plus alors que de remplir ce dernier avec de l'éther de pétrole, et les compartiments latéraux avec la solution tampon veronal (pH 8,4 — $\mu=0,05$).

3. Tubes d'agar pour électrophorèses.

La solution d'agar, préparée à raison de 2 g pour 100 ml de la solution stock tampon veronal ($\mu=0,1$), est répartie dans des tubes à raison de 2 ml de la solution par tube. Après gélification, ces tubes sont bouchés et conservés à 4° C sans limites de temps.

C. Microélectrophorèse des protéines.

Premier temps : préparation de la lame d'agar : la lame d'agar, posée sur un plan horizontal noir, est éclairé tangentiellement. Grâce à un petit appareil facilement réalisable (deux fragments de lame de rasoir de respectivement 4 et 2 mm disposés sur la même ligne et séparés l'un de l'autre par 2 mm), on pratique dans l'agar une entaille à la partie moyenne de la lame, parallèlement à la largeur. Une mince bande de papier filtre de 4 mm de largeur est alors introduite dans la fente en ayant soin de ne pas atteindre le verre. La seule utilité de cette bande de papier est d'aspirer la minime quantité de solution tampon se trouvant dans cette dernière. On prélève alors une certaine quantité d'extrait avec une pipette de Malassez. Grâce à une pipette Pasteur, introduite dans l'extrémité de celle de Malassez, on aspire 3 à 4 microlitres d'extrait. Après avoir enlevé délicatement la bande de papier, on dépose ces 3 à 4 microlitres dans la fente de 4 mm en ayant soin de ne pas toucher les bords. Après avoir rincé la pipette à l'eau distillée, on répète la même opération pour la solution d'ASM dont on dépose une goutte dans la fente de 2 mm. L'utilisation préalable de la pipette de Malassez n'est pas alors nécessaire.

Deuxième temps : électrophorèse proprement dite : la lame, ainsi préparée, est déposée *agar en bas* dans le compartiment central de façon à reposer sur les deux lamelles d'agar surajoutées. Ce compartiment central est recouvert d'une plaque de verre. Ensuite, pendant exactement vingt-cinq minutes, on fait passer le courant (140 volts — 10 à 15 mA). Si plusieurs électrophorèses doivent être pratiquées à la suite, on doit chaque fois inverser les électrodes pour éviter leur polarisation.

Troisième temps : fixation : pendant une heure, la plaque est déposée dans une boîte de Petri contenant la solution de fixation et recouverte

d'une plaque de verre. Lorsque les trois taches de l'ASM sont visibles, on pratique une légère entaille au bistouri dans l'agar selon un plan tangent à la portion distale du MacroDEX puisque ce corps, inerte électriquement, indique par sa position la force du courant d'électroendosmose, contrariant la migration des protéines. Cette entaille indique donc le point zéro de migration.

Quatrième temps : dessiccation : la lame est recouverte d'un petit morceau de papier filtre imbibé de fixatif. Elle est ensuite déposée, *verre en haut*, sur un support garni de papier filtre épais. L'ensemble est enfin abandonné pendant une douzaine d'heures dans une étuve à 37°C.

Cinquième temps : coloration, différenciation, conservation : au moyen de « bac à rainures » des anatomopathologistes, la lame séjourne pendant une heure dans la solution de coloration et, ensuite, trois fois pendant quelques minutes, dans la solution de différenciation. Après séchage à l'air libre ou sur une plaque chauffante à 50°C, la lame est montée avec baume de Canada et grande lamelle. Cette dernière opération n'est pas nécessaire pour la suite. Elle permet seulement une conservation indéfinie du document.

Sixième temps : enregistrement et calcul des résultats : l'Analytrol (Spinco = 650 m μ) donne sur la feuille de papier millimétré deux résultats : la courbe d'absorption et la surface des différents pics par rapport à la ligne de base. En projetant sur cette feuille l'image de l'électrophorèse, on peut donc indiquer exactement les limites des fractions et l'endroit du maximum d'intensité de ces dernières, des taches d'albumine, de sidérophiline ainsi que la position du repérage de la partie distale du macroDEX. Dès lors, deux types de résultats peuvent être calculés : les mobilités relatives (m_r) et les concentrations en pourcentages.

a) Mobilités relatives : on mesure les distances centre tache albumine — partie distale du macroDEX et centre tache sidérophiline — partie distale du macroDEX. Si l'on prend la première mesure comme unité, la seconde aura une valeur de $0,472 \pm 0,012$. On dispose ainsi d'un moyen commode et rapide pour vérifier si l'électrophorèse a été faite dans des conditions satisfaisantes. Ensuite, on trace une perpendiculaire à la ligne de base passant par la partie distale du MacroDEX. Après avoir mesuré la distance séparant le maximum d'intensité d'un pic de cette perpendiculaire, une simple règle de trois permet d'exprimer la valeur mesurée par rapport à l'unité adoptée. On obtient ainsi la « mobilité relative » de la fraction protéique repérée par le pic.

b) Concentrations en pourcentages : on abaisse des perpendiculaires à la ligne de base par les limites des fractions précédemment repérées. Entre chaque perpendiculaire, on compte le nombre de crans (10 crans = 1 cm²). On fait la somme des valeurs obtenues. En rapportant cette somme à 100, on obtient facilement de nouvelles valeurs représentant les « concentrations relatives en pourcentages » des fractions protéiques.

c) Exemple (fig. 6) :

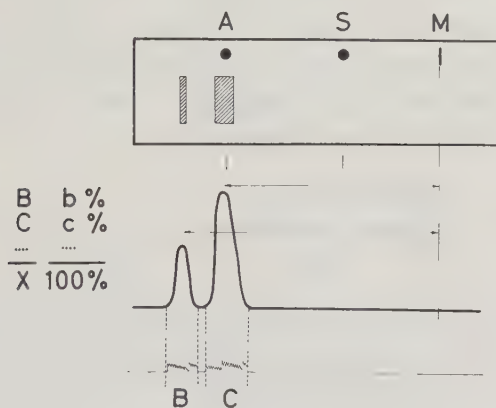
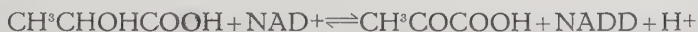


FIG. 6.

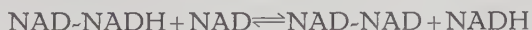
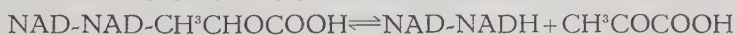
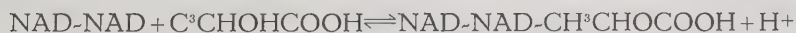
D. Enzymoélectrophorèse.

a) Principe :

Il est maintenant admis que la LDH transforme le L (+) lactate en pyruvate selon la réaction :



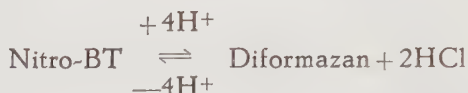
Théoriquement, celle-ci serait le bilan de trois réactions consécutives :



Quoi qu'il en soit, ultérieurement, selon le schéma qu'en ont donné Racker et Gunzalus, une décarboxylation oxydative transforme ce pyruvate en acétate actif ou acétylCoA qui pourra être soit utilisé dans la synthèse des acides gras soit détruit par oxydation dans le cycle de Krebs. Parallèlement, l'hydrogène libéré entre en contact avec l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de la chaîne des cytochromes.

En 1961, Van Der Helm a eu l'idée, pour la mise en évidence de la lactico-déshydrogénase, d'appliquer à l'électrophorèse en agar la technique histochimique publiée par Hess, Scarpeli et Pearse en 1958, technique complétant celles de Pearse (1957) et de Nachlas, Walker et Seligman (1958). Ces auteurs préconisaient, associé au lactate, cyanure, NAD et phénazine méthosulfate, l'usage d'un sel de tétrazolium, le chlorure de 2,2'-di-p-nitrophényl-5,5'-diphényl-3,3'-(3,3'-diméthoxy-4,4'-biphénylène) ditétrazolium, plus connu dans la littérature anglo-saxonne sous le nom de « Nitro-BT ».

Dès lors, le schéma se transforme et devient le suivant. Le cyanure bloque la fin de la chaîne respiratoire en inhibant le cytochrome a3 ou cytochrome oxydase. L'hydrogène non éliminé se combine avec le « Nitro-BT » incolore pour former un diformazan violacé selon la réaction :



Cette réduction est facilitée par la phénazine méthosulfate. Depuis Singer et Kearney, on sait que ce corps accepte réversiblement les électrons directement de la succinodéshydrogénase. Selon Pearse, il augmenterait la vitesse de réaction initiale des déshydrogénases lorsque celle-ci se trouvent en présence d'un sel de tétrazolium dans le milieu. Il est vraisemblable que ceci est dû au fait que son niveau de potentiel de demi-réduction se trouve situé entre ceux des systèmes en présence=lactate-pyruvate ($-0,18$ v. pH 7,2. 22° C), Nitro-BT-Diformazan ($-0,05$ v.) et NAD-NADH² ($-0,32$ v.). Ce principe, bien souligné par Clark, offre la seule solution plausible.

2. Enzymoélectrophorèse proprement dite : dans ses grandes lignes, la technique est identique à l'électrophorèse des protéines. Nous ne ferons que signaler les différences.

Premier temps : préparation de la lame d'agar : deux points=utilisation d'un extrait obtenu différemment et dépôt d'une quantité fixe (4 microlitres) de ce dernier dans la fente. Comme variante, grâce à une modification de l'appareil déjà décrit, on peut pratiquer deux fentes de 2 mm au lieu d'une de 4 mm. On dépose alors dans chacune deux microlitres. La seule utilité de cette variante est de pouvoir faire simultanément deux enzymoélectrophorèses sur la même lame.

Deuxième temps : électrophorèse.

Troisième temps : mise en présence du substrat : un tube de 2 ml d'agar est mis dans un bain-marie bouillant. Lorsque l'agar est liquide,

on laisse la température revenir progressivement à 45°C-50°C. Pendant ce temps, on place la lame d'agar sur un plan rigoureusement horizontal et l'on met successivement dans un tube propre : 4,5 ml de la solution lactate/NaCN/Nitro-BT ; 0,2 ml de la solution aqueuse à 0,1 % de phenazine méthosulfate ; 0,2 ml de la solution aqueuse à 3 % de DPN.

Ensuite, en opérant très rapidement pour prévenir la gélification, on verse le contenu du second tube dans le tube d'agar maintenu à 50 C. On agite. On pipette la totalité du contenu de ce dernier en évitant les bulbes d'air. Enfin, on verse la moitié sur la lame d'agar en prenant soin de ne pas toucher cette dernière avec le bout de la pipette.

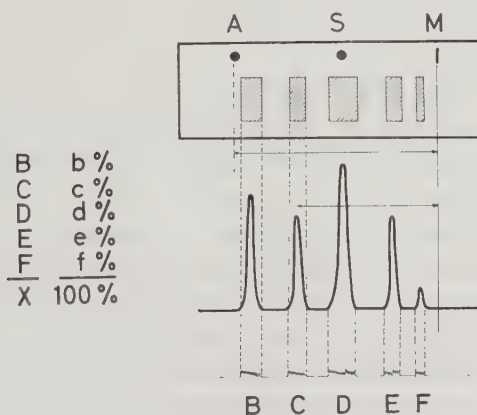


FIG. 7.

Quatrième temps : incubation : Très rapidement, la couche d'agar se gélifie. On place la lame d'agar dans une boîte de Petri que l'on recouvre, et l'on porte l'ensemble dans une étuve à 37°C où il restera pendant une heure.

Cinquième temps : fixation : la fixation est très vite réalisée à l'obscurité. Une demi-heure tout au plus. Il faut parfois attendre plus longtemps pour qu'apparaissent les taches de l'albumine, de la sidérophiline et du macrodex. Pour marquer leur position lorsqu'elles sont devenues visibles, on pratique une légère entaille au bistouri en regard du centre des deux premières et du plan tangent à la portion distale de la troisième.

Sixième temps : dessiccation.

Septième temps : conservation.

Huitième temps : enregistrement et calcul des résultats : la lecture se fait à 549 m μ . La figure 7 montre un exemple de ce calcul.

3. Dosage des éléments minéraux dans le tissu nerveux et ses extraits.

De nombreuses techniques ont été utilisées pour doser les éléments minéraux du tissu nerveux. Leur emploi est très délicat du fait qu'elles ont été établies pour doser un seul métal dans des conditions bien définies et que très souvent dans le tissu nerveux les autres éléments minéraux interfèrent dans le résultat obtenu. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons adopté la technique spectrographique qui permet avec une très grande précision de doser simultanément une dizaine d'éléments minéraux (Cu, Fe, Ag, Mo, Mg, Co, Zn, Mn, Al, P), comme l'a montré Löwenthal.

A. Dosage spectrographique dans le tissu cérébral.

1. Opérations préliminaires :

Premier temps : prélèvement et détermination de la teneur en matière sèche : après les avoir prélevés avec des instruments ne contenant aucun élément métallique, on place les fragments sur des verres de montre et on pèse par double-pesée. On obtient ainsi p = poids du fragment frais. Ensuite, ces fragments, toujours sur verres de montre, sont déshydratés dans une étuve à 102 C — déshydratation complétée après douze heures par le vide — jusqu'à obtention d'un poids constant. A ce moment, encore par double-pesée, on obtient p' = poids du fragment sec. Le pourcentage de la teneur en matière sèche est donc évidemment égal à $\frac{100 \cdot p'}{p}$. Cette détermination permet, certes,

d'apprécier le degré d'hydratation, mais aussi de rapporter ultérieurement, si on le désire, le taux des éléments minéraux au gramme de tissu frais.

Deuxième temps : minéralisation : des quantités connues de matière sèche sont ensuite introduites dans des Kjeldahls en pyrex de 100 à 250 ml selon la grosseur des fragments. On ajoute dans chacun quelques billes de verre et avec précaution 5 à 10 ml d'acide nitrique fumant. Dans un autre Kjeldahl qui servira de blanc, également billes de verre et même quantité d'acide. Sur une rampe à gaz, on chauffe l'ensemble à ébullition pour chasser l'excès d'acide jusqu'à homogénéisation complète du liquide qui devient brunâtre. Arrivé à ce stade, son volume est très restreint. On ajoute alors 5 à 7 ml du mélange nitroperchlorique : acide perchlorique ($d=1,61$) 2 volumes ; acide nitrique ($d=1,39$) 1 volume, et on chauffe l'ensemble des Kjeldahls jusqu'à décoloration complète du liquide, quitte à poursuivre le chauffage après avoir ajouté à nouveau 5 ml du mélange nitroperchlorique dans le ou les matras où la décoloration n'a pas été

obtenue dès la première fois. La décoloration complète témoignant de la destruction totale de la matière organique, la solution est donc prête pour les déterminations spectrographiques.

2. Déterminations spectrographiques : ces déterminations ont été pratiquées dans le laboratoire d'une usine anversoise, et nous tenons tout particulièrement à remercier ici même le directeur de cette usine et ses collaborateurs du service de spectrographie.

Dans ses grandes lignes, le mode opératoire est du même ordre que ceux utilisés dans tous les laboratoires de chimie analytique. Nous n'en donnerons que les points essentiels, renvoyant pour plus de détails au travail de Löwenthal. La solution précédente est reprise avec 5 ml d'acide nitrique et portée à 100 ml. De cette dernière, 10 ml sont mis dans une capsule de quartz en présence de 90 mg de poudre de graphite. Après plusieurs calcinations, on ajoute au contenu de cette capsule 30 mg d'un mélange sec de : Na_2CO_3 150 parties ; GeO_2 1 partie. L'ensemble, homogénéisé, est mis en pastilles.

Une de celles-ci est fixée sur une petite cuvette creusée à l'extrémité d'une électrode de graphite jouant le rôle de cathode dans un arc à incandescence. Ce dernier travaillant à raison de 50 périodes/seconde, la pastie est brûlée en trente secondes. Par l'intermédiaire d'un spectrographe à optique de quartz, cette destruction entraîne sur une plaque photographique des noircissements plus ou moins importants qui sont ensuite comparés à une gamme de noircissement obtenue pour des concentrations connues de chaque élément minéral à doser.

3. Calcul des résultats définitifs : ces déterminations spectrographiques donnent des taux moyens de métaux pour l'ensemble des prises faites sur la solution obtenue après minéralisation. En soustrayant les chiffres donnés par l'essai à blanc, il est facile de ramener ces taux à 100 mg de matière sèche. Comme l'on connaît la teneur en matière sèche, on peut en fin de compte les exprimer par gramme de tissu frais.

B. *Dosage spectrographique dans les extraits cérébraux* : il est identique à celui pratiqué pour le tissu cérébral. Evidemment ici, pas de détermination du taux de matière sèche. Le temps de minéralisation est très rapide. La seule précaution importante est la détermination très soigneuse du volume de la prise de départ. Pour plus de sûreté, il convient de rincer plusieurs fois la pipette à l'eau distillée et d'ajouter la même quantité de cette dernière dans le Kjeldahl réservé au blanc.

4. Techniques statistiques.

Etudiant les rapports existant dans le tissu nerveux entre les fractions protéiques solubles, les isozymes de la LDH et les éléments minéraux, nous avons été amené tout naturellement à utiliser les méthodes statistiques. Elles se sont révélées d'un usage très fructueux en neurochimie. Ces méthodes sont de trois types. Deux de calcul purement statistique : écart type et coefficient de corrélation de Bravais-Pearson. La troisième, pour comparer entre eux ces coefficients, consiste dans l'établissement des variables normales réduites après application de la transformation de Fischer. Nous tenons à remercier M. Ehrlich, maître assistant, pour les conseils qu'il nous a donnés dans le choix de cette méthode.

A. *Calcul de l'écart type* : les formules de l'écart type et de son carré, la variance, sont trop connues pour être rappelées ici. Tout au plus, mentionnerons nous leurs propriétés remarquables. En effet, entre la moyenne et plus ou moins une fois l'écart type, la courbe idéale de Gauss contient toujours une même quantité d'échantillons : 68,3 %. Entre la moyenne et plus ou moins deux fois l'écart type, toujours 95,5 %. Entre la moyenne et trois fois plus ou moins l'écart type, toujours 99,7 %.

Calculer un écart type, surtout lorsque l'on se trouve en présence d'un grand nombre d'échantillons, est extrêmement long en appliquant la formule classique bien qu'elle soit simple. Nous avons préféré utiliser les tables d'écart type de Harter. Ces dernières répondent à la formule générale :

$$\sigma_n = An (w_0 + Bn \cdot w_x)$$

où σ_n représente l'écart type pour le nombre n d'échantillons, An et Bn étant des paramètres variant avec n , w_0 le plus grand écart des valeurs de ces échantillons et w_x le deuxième, troisième, quatrième, etc., plus grand écart. Si on a une suite de valeurs décroissantes, on peut schématiser ainsi w_0 et w_x : (fig. 8).

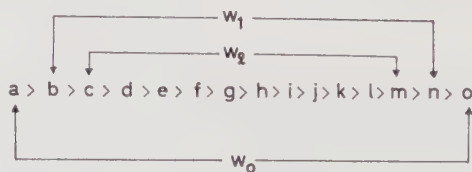


FIG. 8.

Harter donnant dans ses tables pour n échantillons les valeurs An , Bn et x , calculer un écart type se résume alors à déterminer w_0 et w_x et à appliquer la formule.

B. *Calcul du coefficient de corrélation r* : ici aussi nous ne mentionnerons que l'essentiel. Dans un ensemble supposé normal de n échantillons à deux variables x et y appareillées, le nombre « r », donné par la formule :

$$r = \frac{\frac{\sum xy}{n} - \left(\frac{\sum x}{n}\right) \left(\frac{\sum y}{n}\right)}{\sigma x \cdot \sigma y}$$

est une estimation du coefficient de corrélation entre les variables x et y .

Dans quelles limites peut varier un coefficient de corrélation ? Un long raisonnement théorique permet d'aboutir à la formule :

$$-1 \leq r \leq +1$$

Dès lors, quatre cas peuvent se présenter :

Pour $r > 0$, y augmentant, x a tendance à augmenter. La corrélation est « positive ».

Pour $r < 0$, y augmentant, x a tendance à diminuer. La corrélation est « négative ».

Pour $r = 0$, y n'influence pas x . Il n'y a pas de corrélation.

Pour $r = \pm 1$, x est exactement déterminé par y . Il y a une liaison fonctionnelle au sens habituel du mot.

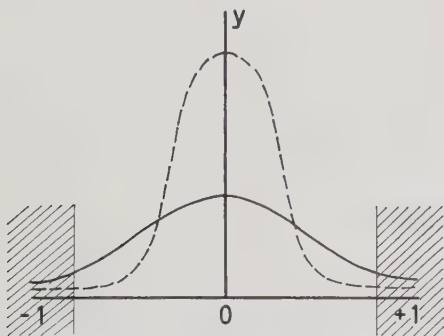


FIG. 9.

Bien que le coefficient de corrélation puisse varier entre -1 et $+1$, toutes les valeurs entre ces deux limites ne sont pas significatives. Les travaux de Fischer, de Student ont permis de pouvoir apprécier la sécurité d'un coefficient de corrélation. Nous ne ferons qu'en donner l'essentiel et surtout ce qui présente un intérêt pratique. La courbe représentative de la loi de distribution d'échantillonnage est une courbe

en cloche symétrique qui enserre de plus en plus l'axe des y à mesure que N augmente. Il en résulte que l'intervalle de sécurité devient de plus en plus réduit lorsque N devient plus grand (fig. 9). Cet intervalle de sécurité, situé de part et d'autre du zéro, doit naturellement comporter des « coefficients de risque » égaux aux deux extrémités, soit $k_1 = k_2$. On peut lire sur les tables de Student les valeurs $T_1 = -T_2$ correspondant, pour $v = N - 2$, aux coefficients de risque égaux $k_1 = k_2$ que l'on s'est fixé, k_1 étant égal à la moitié de la grandeur P figurant dans ces tables. A partir de ces chiffres, Fischer a calculé $-R_2$ et R_1 qui sont les limites inférieures et supérieures, entre lesquelles doit se trouver normalement la valeur du coefficient de corrélation d'un échantillonnage de N individus prélevés au hasard. Si le coefficient de corrélation est en dehors de ces limites, il est *significatif*, c'est-à-dire que l'on peut admettre qu'avec les coefficients de risque choisis $k_1 = k_2$, une corrélation existe *effectivement* entre les deux séries de variables.

En pratique, nous avons utilisé la formule indiquée plus haut et la colonne de la table des valeurs significatives de r de Fischer établie pour un coefficient de risque $k_1 = k_2 = 0,025$. Cette colonne a donc un coefficient de sécurité de $\lambda = 1 - 2k_1$ soit 0,95.

C. Calcul des variables normales réduites après application de la transformation de Fischer :

Comparer des coefficients de corrélation significatifs, établis chacun pour des variables appareillées différentes, surtout pour un nombre d'échantillons non identique et pouvant varier de -1 à $+1$, demande au préalable une normalisation des résultats. Celle-ci est possible en utilisant la table de Fischer de transformation de r en Z . Cette « variable normale Z de Fischer » a pour erreur type :

$$E = \sqrt{\frac{1}{N-3}}$$

N étant le nombre d'échantillons sur lequel a été calculé le coefficient de corrélation. Pourtant, tous les coefficients de corrélation r , transformés en Z , ne sont pas encore comparables. Pour cela, il faut qu'ils soient tous exprimés en une unité commune. La seule solution est d'établir pour chaque Z la « variable normale réduite z ». Elle se calcule en divisant par son erreur type le Z de Fischer :

$$z = \frac{Z}{\sqrt{\frac{1}{N-3}}}$$

On se trouve alors seulement devant des variables homogènes et comparables, autrement dit dans les conditions de la « courbe normale réduite ». L'intérêt d'une telle situation est évident, puisque l'on sait que cette dernière est une courbe standard de moyenne zéro et ayant pour écart type une valeur égale à l'unité. Ainsi, la variable normale réduite z est exprimée en unités d'écart type. Un autre intérêt, tout aussi important, de cette façon de faire est que, pour chaque variable normale réduite z , la table normale réduite donne la probabilité d'apparition pour laquelle elle est significativement différente de zéro. Autrement dit, plus la variable normale réduite z est forte — et, par conséquent, la probabilité d'apparition faible — plus le coefficient de corrélation est significatif, plus étroite est la liaison entre les variables initiales x et y . Dès lors, la comparaison est aisée en utilisant des valeurs absolues : les variables normales réduites ou leurs probabilités d'apparition.

En pratique, l'utilisation successive de deux tables statistiques est nécessaire. La table de transformation de Fischer permet d'abord d'exprimer les coefficients de corrélation r en variables Z . Celles-ci, divisées par leur erreur type, donnent les variables normales réduites z . La table normale réduite, enfin, indique pour ces dernières leur probabilité d'apparition. Cette probabilité représente le pourcentage des résultats supérieurs ou inférieurs pour chaque variable normale réduite comprise entre $+3$ et -3 . Etant donné le mode opératoire, il convient donc de considérer uniquement la moitié de la probabilité d'apparition.

III. — Conclusions

Pour conclure, nous tenons à dire, une fois pour toutes :

1. Que, sauf avis contraire, tous les résultats ultérieurs sont rapportés au gramme de tissu frais.

2. Que, théoriquement, pour chacune des localisations étudiées, nous nous sommes efforcé d'avoir :

Les taux des protéines totales solubles et de l'activité totale LDH.

Une électrophorèse des protéines et une enzymoélectrophorèse.

Les taux des éléments minéraux dans le tissu et son extrait.

CHAPITRE IV

Résultats

Nous exposerons ces résultats en deux grands sous-chapitres : « Cas normaux » et « Cas pathologiques ». Pour chacun, nous envisagerons successivement l'activité lacticodéshydrogénasique totale et isozymique, les protéines hydrosolubles totales et leurs fractions ainsi que les concentrations en éléments minéraux. Pour le premier, nous rapporterons également nos constatations sur le taux de ces derniers dans les extraits.

I. — Cas normaux

I. Lacticodéshydrogénase.

A. LDH totale.

1. *Chez l'homme* : l'activité lacticodéshydrogénasique totale n'est par uniforme dans le système nerveux humain. Exprimés en unités Bücher par rapport au gramme de tissu frais, les chiffres que nous avons obtenus permettent de lui attribuer quatre grands types : « Substance blanche », « Moelle », « Cortex », « Structures grises profondes » (tabl. IX et X). Ces tableaux extériorisent, en outre, le fait que le locus niger et le noyau dentelé ont un niveau d'activité beaucoup plus proche de celui du cortex que les autres structures grises profondes, l'identité étant presque parfaite entre le noyau dentelé et le cortex cérébelleux. Ces résultats dissemblables pourraient être rapportés aux taux d'hydratation dont on connaît les variations selon le type général de localisation. En fait, il n'en est rien. Si, pour éliminer ce facteur variable, on exprime les taux d'activité LDH et de protéines hydrosolubles en fonction d'une quantité fixe de matière sèche, le rapport de ces deux données, autrement dit l'activité par milligramme de protéines hydrosolubles, montre le même type de différence selon la localisation (tabl. XI et XII). Le seul résultat aberrant — celui du cortex cérébelleux — tient à un taux de protéines hydrosolubles beaucoup plus élevé que dans les autres localisations.

TABLEAU IX

		ACTIVITE LDH (u. Bücher/g tissu frais)	
		Nb	Moyenne
Substance blanche	Pied pédoncule	1	720
	Pédoncule cérébelleux moyen . . .	2	655
	Corps calleux	1	770
	Centre ovale	2	650
	Substance blanche périventriculaire .	2	590
	Substance blanche du cervelet . . .	2	690
Moelle	Moelle	4	1045
Cortex	Cortex orbitaire	1	1270
	Cortex F1 F2	1	1070
	Cortex Fa	2	1285
	Cortex insulaire	2	1265
	Cortex temporal	1	1230
	Cortex calloso-marginal	1	1090
	Cortex hippocampe	1	1110
	Noyau amygdale	1	1110
	Corne d'Ammon	2	1395
	Cortex occipital	2	1360
	Cortex cérébelleux	3	1376
Structures grises profondes	Thalamus	1	1680
	Pulvinar	1	1420
	Noyau caudé	4	1567
	Putamen	3	1606
	Pallidum	1	1470
	Noyau rouge	1	1530
	Locus niger	3	1296
	Noyau dentelé	3	1380

TABLEAU X

	ACTIVITE LDH (un. Bücher/g de tissu frais)		
	Nb	Moyenne	Ecart type
Substance blanche	10	666	83
Moelle	4	1045	95
Cortex	17	1271	123
Structures grises profondes	11	1562	201
Locus niger+noyau dentelé	6	1338	127

TABLEAU XI

	Nb	Pour 100 mg de matière sèche	
		Activité LDH (un. Bücher)	Protéines hydrosolubles (mg)
Centre ovale	1	175	6,7
Substance blanche périventriculaire . .	2	179	8,1
Moelle	2	312	11,2
Cortex Fa	2	505	13,8
Cortex insulaire	2	613	17,8
Corne d'Ammon	2	630	14,6
Noyau caudé	3	638	12,8
Putamen	1	461	11,2
Pallidum	1	508	14,5
Cortex cérébelleux	2	556	38,7

TABLEAU XII

Activités L.D.H. par mg de protéines hydrosolubles

	Nb	Moyennes pour 100 g de matière sèche		Rapport
		Taux de protéines (mg)	Activités (u. Bücher)	
Substance blanche	3	7,6	178	23
Moelle	2	11,2	312	27
Cortex	6	15,4	583	37
Structures grises profondes	5	12,8	576	45
Cortex cérébelleux	2	38,7	558	14

Traduits en unités internationales, les chiffres de ce dernier tableau reflètent évidemment les mêmes différences (tabl. XIII).

TABLEAU XIII

 Activité L.D.H. en unités internationales
 (μ M substrat/mg substance de référence/heure)

	Nb	Tissu frais	Tissu sec	Protéine soluble
Substance blanche	3	0,63	1,92	25,07
Moelle	2	1,18	3,40	29,43
Cortex	6	1,43	6,34	40,33
Structures grises profondes	5	1,53	5,83	49,05
Cortex cérébelleux	2	1,46	6,06	15,26

2. *Chez l'animal* : L'activité enzymatique en unités Bücher par gramme de tissu frais varie selon la localisation et aussi l'animal considéré (tabl. XIV).

TABLEAU XIV
Activité L.D.H. (un. Bücher/g tissu frais)

	CHAT		CANARD		OIE		CYGNE		MOUETTE	
	Nb	Act.	Nb	Act.	Nb	Act.	Nb	Act.	Nb	Act.
Bulbe	1	670	1	1100	1	1380	1	1750	—	—
Protubérance	1	770	1	1180	1	1960	1	2100	—	—
Mésencéphale	2	795	1	2160	1	2245	1	2420	—	—
Cervelet	2	1590	1	1630	1	1710	1	2000	1	2060
Cortex hémisphérique	5	1048	1	1200	2	1250	2	1360	1	1460
Corne Ammon	2	890	—	—	1	2220	—	—	—	—
Hippocampe	—	—	1	4800	—	—	1	2820	—	—
Striatum	3	995	—	—	2	995	2	1170	—	—

Bien que le volume total relatif de ces structures puisse interférer dans les résultats, ceux-ci traduisent des différences phylogénétiques nettes. Si l'activité au niveau du striatum demeure sensiblement en plateau chez les oiseaux et les carnassiers, celle très forte du tronc cérébral et des structures archipalliales pour les premiers subit une chute brutale chez les derniers. Enfin, pour ceux-ci, si l'on compare deux animaux appartenant aux deux sous-ordres des « fissipèdes » et des « pinnipèdes », en l'espèce le chat et le phoque, on constate une nette différence dans l'activité LDH corticale (tabl. XV).

TABLEAU XV

	CHAT		PHOQUE	
	Nb	Act.	Nb	Act.
Cortex hémisphérique	5	1048	1	1650
Striatum	3	995	1	770

B. Isozymes de la LDH.

1. *Mobilités* : ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, dans des conditions techniques identiques, un même isozyme de la LDH a, quel que soit le tissu considéré, une mobilité électrophorétique propre pour chaque espèce.

Chez l'homme, pour cent prélèvements considérés à ce point de vue et correspondant à trente-deux localisations nerveuses différentes, nos résultats répondent de façon très satisfaisante à cette règle (tabl. XVI).

Nos résultats pour les localisations nerveuses animales ont également été exprimés en fonction de la solution d'albumine-sidérophiline humaines. Pourtant, il aurait été intéressant de rechercher si les isozymes migrent, quelle que soit l'espèce, avec les mêmes types de protéines. Rassemblés de façon nécessairement arbitraire dans le tableau XVII, ces résultats répondent également très bien à la règle énoncée. En plus, apparaît la notion du nombre différent d'isozymes selon l'espèce. S'il en est cinq pour l'homme, on en trouve six chez d'autres mammifères et même huit pour l'antilope. Chez la tortue et la carpe, leur nombre sera respectivement de quatre et de deux. Pour les oiseaux, de quatre ou de cinq. A ces faits déjà signalés par certains auteurs tels que Markert et Bonavita, doit s'ajouter la constatation que plus le niveau est bas dans l'échelle animale plus les mobilités électrophorétiques sont peu élevées.

2. *Fréquences d'apparition* (en %) : la fréquence d'apparition chez

TABLEAU XVI

	Mobilités des isozymes de la L.D.H. (Homme)					
	Nb	I	II	III	IV	V
Pied du pédoncule	2	922	698	451	209	0
P. dorsale mésencéphale	1	865	631	391	191	-25
Péd. cérébelleux moyen	2	905	678	440	207	-25
Centre ovale	6	921	696	464	229	5
Subst. blanche périventr	5	909	682	449	213	-4
Subst. blanche cervelet	4	910	682	440	198	-29
P. dorsale protubérance	1	915	695	450	220	-5
P. ventrale protubérance	2	939	703	463	219	-7
Moelle	7	915	687	449	221	-3
Cortex orbitaire	1	925	708	465	236	0
Cortex F ₁ F ₂	6	903	687	453	222	-1
Cortex Fa	2	920	692	459	224	-8
Cortex insulaire	6	912	686	454	226	1
Cortex temporal	2	925	704	467	236	5
Cortex callosomarginal	1	919	700	472	241	13
Cortex hippocampique	2	921	695	439	215	-15
Noyau de l'amygdale	1	930	692	460	216	0
Corne d'Ammon	5	914	684	442	199	-26
Cortex occipital	3	915	682	443	213	-11
Corps genouillé externe	1	905	676	466	238	0
Cortex cérébelleux	5	910	681	444	209	-17
Thalamus	1	892	666	425	196	-29
Pulvinar	1	885	655	422	199	-24
Noyau caudé	6	918	697	464	230	0
Putamen	5	904	689	460	225	-5
Pallidum	6	925	700	463	232	0
Noyau rouge	1	931	702	460	224	-19
Locus niger	5	913	688	452	214	-1
Locus caeruleus	1	890	675	430	200	-
Noyau dentelé	4	917	697	453	218	2
Hypophyse	1	909	689	457	226	24
Nerf	4	909	684	445	209	-3
Nombre total	100					
Moyenne		913	689	452	218	-5
Ecart type		15	17	17	19	27

TABLEAU XVII

Mobilités des isozymes de la L.D.H. (animaux)											
HOMME	Nb 100	913	-	689	-	-	452	-	-	-	218 - -5
Chimpanzé	2	942	-	719	-	-	478	-	-	-	242 134 -9
Chat	21	-	747	-	-	559	-	371	-	-	214 109 -
Antilope	12	888	-	735	589	-	441	-	313	-	211 104 -25
Phoque	11	877	-	727	611	532	-	340	-	-	- 140 -
Tortue	3	-	-	-	596	-	410	-	319	-	232 - - -
Carpe	5	-	-	-	-	506	406	-	-	-	- - -
Gobius	3	893	758	-	-	511	-	343	-	-	268 193 - -
Oie	15	-	751	-	-	560	-	-	317	-	242 - 79 -
Canard	7	-	767	-	579	-	-	-	300	-	224 - - -
Mouette	4	-	765	-	-	-	-	-	302	-	229 187 - -
Cygne	11	-	754	-	-	-	-	-	304	-	238 188 - -
Pigeon	3	-	-	-	-	-	-	371	333	285	240 192 - -
Oiseau de mer	3	919	752	-	-	-	422	339	-	-	- 208 97 -

TABLEAU XVIII

	Fréquence d'apparition des isozymes de la L.D.H. chez les oiseaux											
	Mobilités						Fréquence (%)					
	Oie	Canard	Mouette	Cygne	Pigeon	Oiseau de mer	Oie	Canard	Mouette	Cygne	Pigeon	Oiseau de mer
Nombre	15	7	4	11	3	4	15	7	4	11	3	4
-	-	-	-	-	-	919	-	-	-	-	-	25
751	767	765	754	-	752	-	18	12	50	25	-	100
560	569	-	-	-	-	-	6	12	-	-	-	-
-	-	-	-	371	422	-	-	-	-	33	-	100
317	300	302	304	333	339	-	100	100	75	72	100	50
-	-	-	-	285	-	-	-	-	-	-	100	-
242	224	229	238	240	208	-	72	100	100	80	100	100
79	-	187	188	192	97	-	6	-	25	32	66	100

	Fréquence d'apparition des isozymes de la L.D.H. chez la tortue et les poissons					
	Mobilités			Fréquence (%)		
Espèce	Tortue	Carpe	Gobius	Tortue	Carpe	Gobius
Nombre	3	5	3	3	5	3
	-	-	893	-	-	100
	-	-	758	-	-	100
	596	506	511	100	83	100
	410	406	-	100	100	-
	319	-	343	100	-	100
	232	-	268	33	-	100
	-	-	193	-	-	66

l'homme est de 100 % pour les quatre premiers isozymes et de 96 % pour le cinquième. En effet, sur les cent cas examinés, quatre, répondant au noyau dentelé et au *locus caeruleus*, n'ont pas présenté d'activité au niveau de ce dernier avec la technique employée. Cette fréquence d'apparition presque parfaite pour tous les isozymes n'est pas le fait des animaux (tabl. XVIII et XIX). Les mammifères

TABLEAU XIX

Espèce	Fréquences d'apparition des isozymes de la L.D.H. chez les mammifères									
	Mobilités					Fréquence (%)				
Nombre	Homme	Chimpanzé	Chat	Antilope	Phoque	Homme	Chimpanzé	Chat	Antilope	Phoque
	100	2	21	12	11	100	2	21	12	11
	913	942	-	888	877	100	100	-	8	100
	689	719	747	735	727	100	100	100	100	100
	-	-	559	589	611	-	-	100	100	11
	452	478	371	441	532	100	100	100	100	100
	-	-	-	313	340	-	-	-	100	100
	-	-	273	-	-	-	-	25	-	-
	218	242	214	211	-	100	100	100	58	-
	-	134	109	104	140	-	100	90	41	100
	-5	-9	-	-25	-	96	100	-	16	-

— surtout le chimpanzé — sont les plus proches de l'homme à ce point de vue. Dans les autres classes, la fréquence de 100 % apparaît de façon préférentielle pour les isozymes de mobilités électrophorétiques les plus lentes.

TABLEAU XX

Espèce	Localisations	Nb	Activité en %						
Mobilités			-	-	596	410	319	232	-
Fortue	P. ant. encéphale	1	31,5	<u>63,7</u>	4,8				
	P. post. encéphale	1	36,2	<u>59,5</u>	4,3				
	Cervelet	1	22,7	<u>45,1</u>	5,0	27,2			
Mobilités			-	-	506	400	-	-	-
Carpe	P. ant. encéphale	1		<u>100,0</u>					
	P. post. encéphale	1	34,6	<u>65,4</u>					
	Tronc cérébral	1	39,3	<u>60,7</u>					
	Cervelet	1	40,5	<u>53,5</u>					
	Moelle	1	37,6	<u>62,4</u>					
Mobilités			893	758	511	-	343	268	193
Gobius	Hémisphère	1	3,4	9,0	13,6	<u>29,2</u>	29,3	5,4	
	Tronc cérébral	1	1,8	6,6	23,0	<u>28,6</u>	16,4	<u>23,6</u>	
	Moelle	1	1,2	3,3	17,4	<u>45,5</u>	32,6		

TABLEAU XXI

Espèce	Localisation	N°	Activité en %							
Mobilités			-	751	560	-	317	-	242	79
Oie	Cortex	1		1,9	-		<u>26,5</u>		-	<u>1,6</u>
	Cortex	2		-	-		<u>47,1</u>		52,9	-
	Corne d'Ammon			4,3	1,2		<u>50,9</u>		43,6	-
	Hippocampe	1		-	-		<u>52,5</u>		47,5	-
	Noyaux base	1		-	-		<u>100,0</u>		-	-
	Néostriatum	1		-	-		<u>100,0</u>		-	-
	Mésencéphale	2		-	-		42,2		<u>57,5</u>	-
	Protubérance	1		-	-		35,1		<u>64,9</u>	-
	Bulbe	1		-	-		40,5		<u>59,5</u>	-
	Cervelet	2		-	-		<u>51,8</u>		48,2	-
	Noyau dentelé	1		-	-		<u>52,8</u>		46,2	-
Nerf optique	1		0,9	-		36,2		<u>62,9</u>	-	
Mobilités	Canard		-	767	579	-	300	-	224	-
	Cortex	2		4,4	2,7		43,3		<u>53,1</u>	
	Hippocampe			-	-					
	Corne d'Ammon	1		-	-		33,0		<u>67,0</u>	
	Mésencéphale	1		-	-		46,5		<u>53,5</u>	
	Bulbe	2		-	-		43,8		<u>56,2</u>	
Cervelet	1		-	-		<u>58,2</u>		41,7		
Mobilités			-	765	-	-	302	-	229	188
Mouette	Corne d'Ammon	1		-	-		40		<u>59,9</u>	-
	Noyaux base	1		-	-		-		45,3	<u>54,7</u>
	Tronc cérébral	1		1,5	-		47,3		<u>51,2</u>	-
	Cervelet	1		1,3	-		36,9		<u>61,8</u>	-
Mobilités			-	754	-	-	304	-	238	166
Cygne	Cortex	2		-	-		<u>51,7</u>		48,3	-
	Hippocampe	1		-	-		-		43,8	<u>56,2</u>
	Noyaux base	1		-	-		-		<u>66,2</u>	33,8
	Néostriatum	1		-	-		<u>49,8</u>		<u>50,2</u>	-
	Mésencéphale	1		1,6	-		<u>56,9</u>		-	41,5
	Protubérance	1		-	-		-		34,0	<u>66,0</u>
	Bulbe	2		4,4	-		44,6		<u>53,1</u>	-
	Cervelet	1		-	-		<u>100,0</u>		-	-
	Chiasma	1		1,3	-		<u>47,6</u>		<u>51,1</u>	-
Mobilités			-	-	-	371	333	285	240	192
Pigeon	Cortex +	2		-	-		<u>24,4</u>	20,3	21,8	23,4
	Noyaux base									
	Noyaux base	1				27,8	22,3	20,8	<u>29,1</u>	-
Mobilités			919	752	-	422	339	-	208	97
Oiseau de mer	Hippocampe	1	0,5	6,9	-	2,3	2,0		45,6	42,7
	Tronc cérébral	1	-	3,3	-	4,7	-		36,9	<u>55,1</u>
	Cervelet	1	-	2,3	-	1,1	4,7		<u>47,4</u>	44,5

3. *Pourcentages d'activité*: pour Wroblewski, la distribution de l'activité enzymatique entre les isozymes est, dans des conditions identiques, constante statistiquement et de ce fait, spécifique pour un tissu d'une espèce donnée. Si ce fait a été prouvé pour les différents tissus, en

TABLEAU XXII

Espèce	Localisations	Nb	Activité en %							
Mobilités			942	719	-	478	-	-	242	134 - 9
Chimpanzé	Cortex frontal	1	22,0	26,6		<u>27,2</u>			13,9	7,8 1,8
	Centre ovale	1	22,7	28,5		<u>30,0</u>			14,9	2,4 1,5
Mobilités			-	747	559	-	371	273	214	109 -
Chat	Cortex	7	<u>24,5</u>	26,6		24,8	6,6	11,1	1,5	
	Corne d'Ammon	2	<u>22,4</u>	26,1		26,5	-	12,3	2,5	
	Noyau caudé	2		27,0		<u>29,6</u>	-	12,7	3,2	
	Noyau lenticul.	2	<u>28,1</u>	25,2		23,4	-	9,7	3,5	
	Thalamus	1	<u>42,0</u>	21,5		24,1	-	10,3	2,1	
	Mésencéphale	2	<u>43,4</u>	27,0		19,6	-	6,4	3,4	
	Protubérance	2	<u>54,4</u>	25,5		14,5	2,6	3,1	2,1	
	Moele + Bulbe	1	<u>40,6</u>	24,2		16,2	8,2	6,9	1,9	
	Noyaux cervelet	2	<u>47,2</u>	24,2		13,3	6,8	9,9	1,5	
Mobilités			268	735	589	441	313	-	211	104 -25
Antilope	Cortex frontal	1	-	<u>29,1</u>	22,3	27,4	13,4		5,5	- 2,3
	Corne d'Ammon	1	-	<u>50,5</u>	20,3	21,7	7,5		-	-
	Corps calleux	1	-	<u>49,5</u>	17,0	25,0	4,5		-	3,2 -
	Noyau caudé	1	-	<u>37,4</u>	16,5	26,6	12,8		2,4	-
	Noyau lenticul.	1	-	<u>29,2</u>	22,4	27,8	13,9		1,8	4,8 -
	Thalamus	1	-	<u>20,8</u>	17,2	26,7	13,8		10,8	0,7 -
	Mésencéphale	2	1,5	<u>21,9</u>	23,5	26,7	11,7		4,3	3,2 2,2
	Moele cervic.	1	-	<u>53,4</u>	16,6	27,2	2,8		-	-
	Cortex cervelet	1	-	<u>24,2</u>	22,0	17,9	3,4		0,8	1,6 -
	Subst. blanche cervelet	1	-	<u>57,0</u>	20,1	19,9	2,4		-	-
	Noyaux cervelet	2	-	<u>75,4</u>	14,6	9,5	0,5		-	-
Mobilités			77	727	611	532	340	-	-	140 -
Phoque	Cortex frontal	1	13,0	23,2	-	<u>26,8</u>	19,5			12,9
	- occipital	1	10,0	24,9	-	<u>20,2</u>	18,0			10,9
	- temporal	1	10,5	23,5	-	<u>29,5</u>	18,5			12,0
	- insulaire	1	20,0	25,4	-	<u>26,1</u>	17,0			11,5
	- pariétal	1	19,7	<u>31,2</u>	-	22,3	17,0			9,8
	- Fa	1	17,7	<u>26,8</u>	-	24,8	17,8			10,9
	Corne d'Ammon	1	15,4	20,5	-	<u>29,6</u>	18,4			16,1
	Centre ovale	1	17,8	22,8	-	<u>26,0</u>	19,0			13,8
	Noyau caudé	1	23,5	<u>26,2</u>	-	25,4	15,4			9,5
	Noyau lenticul.	1	17,1	23,6	-	<u>26,9</u>	20,0			12,4
	Thalamus	1	19,9	<u>21,0</u>	15,0	11,8	18,0			14,3

est-il de même pour le système nerveux ? Existe-t-il un « pattern » spécifique du tissu nerveux ?

Cette règle se vérifie pour les reptiles et les poissons, mais uniquement pour eux seuls. Déjà dans l'enzymogramme du tronc cérébral du Gobius, on peut noter pour les isozymes de mobilités 268 et 193 des pourcentages d'activité bouleversant la distribution type de cette espèce (tabl. XX).

Ce bouleversement est l'évidence si l'on considère la classe des oiseaux (tabl. XXI). Dès ce niveau, on peut avancer que *la distribution d'activité enzymatique entre les isozymes est spécifique non pas du tissu nerveux mais de la localisation dans ce dernier, ou tout au moins du type général de localisation, puisque le nombre des isozymes est restreint dans ces espèces*. Dans cet ordre d'idée, si on considère les deux isozymes les plus actifs, le maximum d'activité se trouvera par exemple pour le cervelet sur l'isozyme le plus rapide, et pour les structures du tronc sur le plus lent.

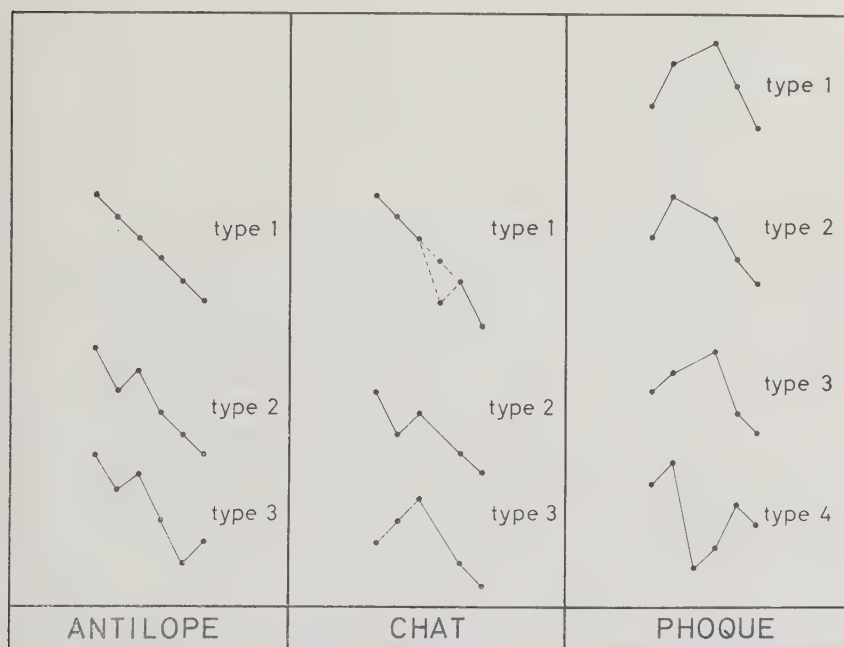


FIG. 10.

Cette spécificité, selon la localisation, est encore bien plus manifeste chez les mammifères (tabl. XXII). Si pour le chat et l'antilope le maximum d'activité se trouve pour ainsi dire toujours au niveau du même isozyme, la distribution d'activité entre les divers isozymes se fait selon plusieurs types ? Si l'on excepte le chimpanzé, pour lequel nous n'avons pu disposer que de deux extraits, on peut distinguer trois grands types de distribution pour l'antilope, trois pour le chat et quatre pour le phoque. Ces types de distribution sont schématisés dans la fig. 10. Pour l'antilope, le type « un » répond à toutes les structures cérébelleuses, le type « trois » au noyau lenticulaire et le type « deux » à toutes les autres localisations examinées. Pour le

chat, le type « trois » répond au noyau caudé, le type « deux » au thalamus et le type « un » aux noyau lenticulaire, mésencéphale, cortex hémisphérique, corne d'Ammon, noyaux du cervelet, protubé-

TABLEAU XXIII

Localisations	NL	Activité en %				
		I	II	III	IV	V
Pied pédoncule	2	25,5	<u>31,2</u>	29,4	12,0	1,2
Pédoncule cérébelleux moyen	1	27,3	<u>32,2</u>	28,3	11,6	0,0
Corps calleux	1	27,4	<u>31,1</u>	27,8	13,0	0,7
Centre ovale	3	28,0	<u>32,3</u>	20,7	12,4	0,6
Subst. blanche périventriculaire	2	27,0	<u>31,0</u>	27,8	13,3	0,3
Subst. blanche cervelet	1	29,6	<u>31,9</u>	26,2	11,1	1,2
P. dorsale mésencéphale	1	<u>30,4</u>	26,9	27,2	13,1	2,4
P. dorsale pont	1	<u>29,2</u>	27,9	24,8	14,0	3,4
P. ventrale pont	1	<u>29,6</u>	28,8	26,5	13,4	1,7
Moelle	3	29,6	<u>32,5</u>	26,5	9,6	1,8
Nerf	4	3,8	12,3	25,3	24,5	<u>31,2</u>
Cortex orbitaire	1	<u>27,7</u>	<u>27,6</u>	<u>27,8</u>	14,8	2,1
- F ₁ F ₂	3	25,0	26,5	<u>29,4</u>	16,8	2,3
- Fa	2	<u>29,2</u>	27,2	26,3	15,4	1,9
- insulaire	3	<u>28,9</u>	27,2	24,2	16,8	2,9
- temporal	2	25,8	27,1	<u>28,0</u>	17,3	1,8
- callosomarginal	1	29,8	<u>31,0</u>	26,8	10,3	2,1
- hippocampique	2	<u>28,1</u>	26,8	25,2	16,0	3,9
Noyau amygdale	1	27,3	<u>28,5</u>	27,8	15,0	1,4
Corne d'Ammon	3	25,5	27,8	<u>28,7</u>	16,4	1,6
Cortex occipital	2	<u>29,7</u>	28,8	26,6	14,1	0,8
Corps genouillé ext.	1	24,1	<u>28,2</u>	25,0	16,0	6,7
Cortex cérébelleux	2	<u>29,3</u>	28,3	26,8	13,7	1,9
Thalamus	1	<u>31,3</u>	27,6	25,6	14,1	1,4
Pulvinar	1	<u>30,6</u>	28,2	27,0	13,6	0,6
Noyau caudé	5	23,2	24,6	<u>28,6</u>	19,1	4,5
Putamen	3	24,2	24,5	<u>28,0</u>	18,0	5,3
Pallidum	2	25,8	<u>26,5</u>	<u>26,5</u>	16,2	5,0
Noyau rouge	1	<u>31,3</u>	29,3	25,4	12,9	1,1
Locus niger	2	<u>29,7</u>	26,8	27,2	15,2	1,1
Locus caeruleus	1	<u>48,1</u>	31,7	18,3	1,9	-
Noyau dentelé	4	<u>36,4</u>	33,9	22,2	7,4	0,1
Hypophyse (totale)	1	18,9	30,7	<u>32,2</u>	14,7	3,5

rance, moelle cervicale et bulbe avec apparition d'un isozyme de mobilité 273 ayant pour cette dernière localisation une activité intermédiaire entre celles des isozymes de mobilités 371 et 214 et pour le cortex hémisphérique, les noyaux du cervelet et le pont entre celle des isozymes de mobilités 214 et 109. Enfin, pour le phoque, le type

« un » répond à la corne d'Ammon, au centre ovale, au noyau lenticulaire, aux cortex pariétal, temporal et occipital, le type « deux » aux cortex pariétal, frontal ascendant et au noyau caudé, le type « trois » au cortex insulaire et le type « quatre » au thalamus. Ces divers grands types de distribution rendent plus aisée une classification des localisations nerveuses, traduisent sans doute une organisation métabolique cellulaire générale du même ordre, mais ne permettent pas d'affirmer l'identité d'activité des structures réunies sous le même type. A titre d'exemple, si l'on considère le cortex, la substance blanche et les noyaux du cervelet de l'antilope, il est évident, bien que ces

Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5
				
P. dors. ventrale pont Cortex Fa - insulaire - hippocampe - occipital - cérébelleux Thalamus-pulvinar Noyau rouge Locus caeruleus Noyau dentelé P dorsale mésencéph. Locus niger	Subst. bl. cervelet Centre ovale Moelle Cortex callosomarginal Pied pédoncule Péd. cérébell. moyen Corps calleux Subst. bl. périvent. N. amygdale Corps genouillé ext	Cortex F ₁ F ₂ - temporal Corne Ammon N. caudé Putamen Pallidum Hypophyse	Cortex orbitaire	Nerf

FIG. 11.

trois localisations soient du type « un », que l'enzymogramme des noyaux n'est absolument pas superposable à celui du cortex. *En d'autres termes, contrairement à Wroblewski, on peut affirmer que dans une espèce donnée, une distribution d'activité enzymatique entre les isozymes est spécifique pour une localisation nerveuse et uniquement pour elle.*

Nos résultats chez l'homme illustrent très bien cette donnée nouvelle (tabl. XXIII). On constate que le maximum d'activité peut se trouver sur quatre isozymes différents selon la localisation : les trois premiers et le cinquième. De ces résultats, on peut également isoler cinq types généraux de distribution de l'activité, types que nous avons schématisés dans la fig. 11 avec en regard de chacun les structures qui y correspondent. Comme pour les localisations cérébelleuses de l'antilope, il est également évident que les enzymogrammes du noyau

dentelé, du *locus caeruleus* et du thalamus ne sont pas superposables bien qu'appartenant au même type.

L'ensemble de ces faits, du moins pour le système nerveux, infirme la position adoptée par Wroblewski et permet d'avancer de façon sûre pour la distribution de l'activité isozymique que la notion de spécificité est liée uniquement à la localisation. Cette affirmation est donc la réponse à la première des deux questions que nous posions au début de ce travail. Ultérieurement, nous essayerons d'expliquer les raisons de ce type de spécificité.

2. Protéines hydrosolubles.

A. Taux de protéines totales des extraits.

L'ensemble de nos résultats (tabl. XXIV) met en évidence que le taux moyen de protéines hydrosolubles dans les extraits est de l'ordre de 20 mg par millilitre avec une légère prépondérance dans les structures grises profondes. Ce chiffre est en accord avec les constatations d'autres auteurs, tels que Van Sande. Toutefois, nos résultats aberrants pour le cortex cérébelleux ne sont pas liés à un taux différent de matière sèche par gramme de tissu frais. Ce dernier est identique pour tous les types de cortex.

TABLEAU XXIV

Concentration en protéines des extraits (mg/ml)

	Substance blanche	Cortex	Cortex cérébelleux	Structures grises prof.
Nombre	15	23	3	24
Moyenne	17,3	18,0	45,0	21,4
Ecart type	5,1	4,0	3,2	4,2
Mat. sèche (mg/g tissu frais)	303	245	244	266

B. Fractions protéiques.

Dans un article récent avec Neimarevic, nous avons essayé de montrer combien, par son fractionnement important, l'électrophorèse en agar était une méthode essentielle pour l'étude des protéines hydrosolubles du système nerveux central. Nous rapportons ici l'essentiel de cet article, complété par des résultats ultérieurs.

1. Mobilités relatives.

Les mobilités relatives moyennes des fractions protéiques des zones de préalbumines, albumine et globulines α , β et γ — nommées ainsi par analogie des migrations électrophorétiques avec celles du sérum

TABLEAU XXV

Pied du pédoncule	2	-	1321	1290	1216	-	1087	1007	925	857	770	700	593	514	442	414	296	195	107	-	18	-46	-
Pédonc. cér. moyen	2	-	1350	1270	1180	1160	1085	1000	912	842	773	689	-	524	447	380	327	207	111	76	60	-22	-
Corps calleux	1	-	-	-	-	1140	1140	1062	990	905	850	775	695	-	534	465	423	342	224	112	53	-21	-
Centre ovale	6	-	1380	1295	1200	1141	1068	989	907	845	767	698	-	513	446	409	325	210	118	74	21	-17	-
Subst.bl.pérvient.	7	-	1323	1291	1213	1127	1072	995	905	853	759	688	588	527	456	417	327	215	129	77	36	-13	-124
Subst.bl.cervelet	4	-	1320	1282	1192	1130	1071	998	914	835	760	694	635	534	434	408	312	199	108	73	20	-15	-112
P.dors.mésencéphale	1	-	-	1240	1208	-	1086	990	910	895	764	694	585	507	447	412	307	214	166	89	20	-50	-
P.ventrale pont	2	-	-	1272	1219	1120	1073	990	910	870	777	702	561	515	434	-	321	225	115	61	-	-5	-
P.dorsale pont	2	-	1330	1270	1200	1131	1072	985	905	847	756	679	-	-	434	401	295	190	151	79	16	-35	-107
Moelle	7	-	1319	1274	1192	1132	1073	997	900	856	778	697	-	527	435	-	318	210	123	65	23	-9	-70
Nerf	4	-	-	-	-	-	-	979	-	855	781	691	634	493	455	422	283	230	151	84	34	-	-
Cortex orbitaire	1	-	1305	-	1162	-	1070	1000	925	852	785	725	-	536	442	-	337	248	126	-	-	0	-
- frontal	8	1410	1336	1269	1211	1146	1063	995	909	839	767	693	-	516	450	404	311	219	109	62	8	-16	-
- insulaire	6	-	-	1278	1175	1143	1062	994	907	835	780	695	-	514	438	409	313	215	114	-	16	-7	-
- temporal	2	-	-	1271	1172	-	1060	985	901	829	-	692	-	514	448	406	317	222	115	-	-	-8	-
- callosomargin.	1	-	-	1255	-	-	1070	975	886	826	751	678	-	520	-	407	307	185	-	85	-	-11	-
- hippocampique	2	-	-	1290	1181	1156	1069	995	916	840	762	700	-	532	446	401	322	226	110	-	10	-55	-
Noyau amygdale	1	-	-	1268	-	-	-	995	918	-	746	695	-	515	420	383	318	237	131	-	30	0	-
Corne d'Ammon	6	-	1326	1274	1205	1140	1065	996	915	850	766	700	-	524	445	401	332	215	122	-	22	-1	-
Cortex occipital	3	-	1315	1289	-	1099	1070	1000	922	-	770	705	-	506	447	401	329	234	125	88	8	-9	-
Corps genouillé ext	1	-	-	1280	-	1140	1030	975	885	815	782	665	-	-	438	-	336	220	121	-	44	-15	-
Cortex cérébelleux	5	-	1320	1292	1208	1129	1070	996	916	832	760	700	-	526	452	396	322	229	110	-	22	-20	-
Thalamus	2	-	-	1290	-	1123	1090	1000	926	813	-	707	-	-	459	405	336	226	117	-	13	-	-
Noyau caudé	6	-	1330	1275	1197	1106	1074	994	905	857	767	694	-	523	438	403	325	229	118	-	24	-24	-
Putamen	6	1456	1315	1262	1185	1120	1087	993	919	841	780	689	616	512	442	397	311	201	105	-	14	-20	-
Pallidum	5	-	1340	1277	1225	1131	1061	996	916	846	772	700	-	523	443	412	323	225	124	68	17	-11	-
Noyau rouge	1	-	-	1290	-	1128	-	1005	930	860	790	702	-	535	432	402	331	232	110	-	16	-16	-
Locus niger	4	-	1344	1266	1170	1130	1072	998	927	866	770	699	605	527	444	412	322	217	115	80	20	-5	-
Locus caeruleus	1	-	-	1290	-	1135	-	995	919	850	775	702	-	-	459	406	319	222	118	-	39	-10	-
Noyau dentelé	5	-	1330	1260	1230	1130	1065	1004	929	854	784	706	581	533	448	421	324	220	109	79	28	-11	-
Hypothalamus	1	-	-	1256	-	1115	-	975	902	840	760	688	-	516	422	-	305	220	103	-	-	-18	-
Moyennes générales		1434	1332	1277	1198	1133	1069	1003	914	846	770	697	603	523	445	406	319	214	114	72	23	-15	-102
Ecart type		-	18	18	19	16	17	11	15	16	17	13	-	18	15	11	15	19	16	7	16	13	-

sanguin — coïncident de façon satisfaisante avec les chiffres donnés par Van Sande. Quelques particularités sont toutefois à signaler.

Sur les 104 phérogrammes des extraits de structures corticales et surtout profondes pratiqués, nous avons obtenu seize fractions de façon régulière et trois autres beaucoup moins fréquemment (tabl. XXV). En premier lieu, quatre préalbumines aux mobilités moyennes respectives de 1.300, 1.198, 1.133 et 1.069. La première préalbumine ($mr=1.300$) peut se subdiviser en deux sous-fractions aux mobilités moyennes de 1.332 et 1.277. Dans un phérogramme d'un extrait de putamen et dans celui d'un extrait du cortex de la frontale ascendante, nous avons trouvé une fraction extrêmement rapide ($mr=1.434$). Si la zone de l'albumine est constante et bien isolée statistiquement ($mr=1.003$ et $\sigma \pm 11$), il n'en va pas de même de celle des α -globulines. Cinq fractions γ sont fréquentes. Leurs mobilités moyennes de 914, 846, 770, 697 et 523. Comme l'albumine, l' α -globuline de mobilité, 697 présente seule le même isolement statistique ($\sigma = \pm 13$). Si les globulines de la zone β ont des mobilités de 445 et 406, la zone γ est caractérisée par la quasi-constance de ses quatre fractions ($mr=319$, 214, 107 et 5). Comme la première préalbumine, les deux γ -globulines les plus lentes peuvent se subdiviser chacune en deux sous-fractions ($mr=114$ et 72; $mr=23$ et —15). Exceptionnellement, nous avons enfin rencontré une fraction de mobilité —118.

2. Fréquences d'apparition (%).

De l'examen du tableau des fréquences d'apparition (tabl. XXVI), les protéines solubles cérébrales sont caractérisées dans leur ensemble par la constance de l'albumine et la quasi-constance de la première préalbumine ($mr=1.332$ et 1.277), des α -globulines de mobilités relatives 914 et 697, de la β -globuline de mobilité 445 et des quatre γ -globulines. On ne peut tenir compte de la β -globuline, puisque les extraits sont toujours plus ou moins contaminés par le sang et que l'hémoglobine migre dans cette région. Il s'ensuit que seulement huit et non neuf fractions sont prépondérantes dans les protéines hydrosolubles. Si l'on considère les fréquences d'apparition de ces fractions selon les types généraux de localisation, on constate que celles-ci sont un peu moins élevées : pour la substance blanche et le cortex, au niveau de l' α -globuline de mobilité 914 et de la première γ -globuline (80 à 90 %); pour la moelle, où il faut d'ailleurs signaler l'absence constante de l' α -globuline de mobilité 841, au niveau de la première préalbumine (70 à 80 %); pour les structures grises profondes, au niveau de l' α -globuline de mobilité 914 (80 à 90 %). Dans ce dernier cas, cette diminution de fréquence s'associe à une augmentation pour

TABLEAU XXVI

	Fréquences d'apparition en %																						
	Nb	1434	1332	1277	1198	1133	1069	1003	914	846	770	697	603	523	445	406	319	214	114	72	23	-15	-102
stance blanche	31	-	<u>39 61</u> 90	45	42	77		100	81	84	81	97	10	71	90	52	87	100	<u>84 58</u> 97	<u>58 71</u> 100		13	
lle	4	-	<u>25 75</u> 75	50	25	100		100	100	-	50	100	-	75	100	-	100	100	<u>100 100</u> 100	<u>75 25</u> 100		-	
tex	38	3	<u>37 76</u> 97	29	50	60		100	92	76	74	92	-	82	87	63	100	95	<u>79 21</u> 95	<u>50 63</u> 97		-	
structures grises profondes	31	3	<u>32 64</u> 87	23	48	55		100	87	100	87	100	10	81	90	51	100	97	<u>87 32</u> 100	<u>68 68</u> 100		-	
cales	104	2	<u>35 68</u> 91	33	46	65		100	87	83	80	95	6	78	89	55	96	97	<u>83 38</u> 97	<u>59 65</u> 99		-	

TABLEAU XXVII

	Nb	1434	1332/1277	1198	1133	1069	1003	914	846	770	697	603	523	445	406	319	214	114/72	23/-15	-103
ied du pédoncule	2	-	100	50	-	100	100	100	100	100	50	100	100	50	50	50	100	100	100	-
édoncule cérébel- eux moyen	2	-	100	-	100	100	100	100	100	100	-	100	100	50	100	50	100	100	100	-
entre ovale	10	-	80	50	40	70	100	50	100	60	100	-	90	100	40	80	100	90	100	-
ubst.bl.périvent.	7	-	100	43	43	57	100	86	43	86	86	-	43	86	43	100	100	100	100	14
ubst.bl.cervelet	4	-	100	50	25	100	100	100	100	100	100	-	75	100	50	100	100	100	100	50
, ventrale pont	2	-	100	50	50	100	100	100	50	100	50	50	100	100	-	100	100	100	100	-
, dorsale pont	2	-	100	50	50	100	100	100	100	50	100	-	-	50	100	100	100	100	100	50
celle	4	-	75	50	25	100	100	100	-	25	100	-	75	100	-	100	100	100	100	-
ortex Fa	3	33	66	33	66	66	100	100	66	66	100	-	100	66	100	100	100	66	100	-
- F ₁ F ₂	8	-	100	37	50	62	100	75	87	87	75	-	75	100	62	100	100	87	100	-
- insulaire	6	-	100	33	33	50	100	83	100	66	100	-	83	100	50	100	83	83	100	-
- temporal	2	-	100	50	-	50	100	100	100	-	100	-	50	50	50	100	50	100	100	-
- hippocampique	2	-	100	50	50	100	100	100	100	100	100	-	100	100	50	100	100	100	100	-
orne d'Ammon	6	-	100	16	83	16	100	83	83	83	83	-	83	83	50	100	100	100	100	-
ortex occipital	3	-	100	-	100	66	100	100	-	66	100	-	100	100	66	100	100	100	100	-
- cérébelleux	5	-	100	20	40	100	100	100	80	60	100	-	60	100	80	100	100	100	100	-
halamus	2	-	100	-	50	50	100	100	100	-	100	-	-	100	50	100	100	100	100	-
oyau caudé	5	-	100	20	20	60	100	60	100	100	100	-	80	80	40	100	100	100	100	-
utamen	6	10	100	33	66	33	100	66	100	66	100	16	100	83	66	100	100	100	100	-
allidum	5	-	80	20	60	80	100	100	100	100	100	-	80	100	20	100	100	100	100	-
ocus niger	4	-	75	50	50	50	100	100	100	100	100	25	100	100	75	100	100	100	100	-
oyau dentelé	5	-	80	-	-	80	100	100	100	100	100	20	100	80	60	100	100	100	100	-

l' α -globuline de mobilité 770 (80 à 90 %) et à la présence à 100 % de celle de mobilité 846.

Peut-on aller plus loin dans ce genre de classification ? Le tableau XXVII montre que ces huit types de fractions sont présents à 100 % dans la substance blanche cérébelleuse, les parties ventrale et dorsale de la protubérance, le thalamus et les cortex occipital, hippocampique et cérébelleux. Seule, la fréquence d'apparition de la première préalbumine est plus basse pour le noyau dentelé, le pallidum, le locus

TABLEAU XXVIII

	préA	A	α_{914}	α_{846}	α_{697}	γ
Cortex hippocampique	100	100	100	-	100	100
- occipital	100	100	100	-	100	100
- cérébelleux	100	100	100	-	100	100
P. dorsale du pont	100	100	100	-	100	100
P. ventrale du pont	100	100	100	100	100	100
Subst. bl. cervelet	100	100	100	100	100	100
Thalamus	100	100	100	100	100	100
Moelle	-	100	100	-	100	100
Noyau dentelé	-	100	100	100	100	100
Pallidum	-	100	100	100	100	100
Locus niger	-	100	100	100	100	100
Putamen	100	100	-	100	100	100
Noyau caudé	100	100	-	100	100	100
Péduncule cérébelleux moyen	100	100	100	100	100	-
Pied du péduncule	100	100	100	100	100	-
Cortex temporal	100	100	100	100	100	-
Subst. bl. périventriculaire	100	100	-	-	-	100
Corne d'Ammon	100	100	-	-	-	100
Centre ovale	-	100	-	100	100	-
Cortex Fa	-	100	100	-	100	-
- F ₁ F ₂	100	100	-	-	-	-
- insulaire	100	100	-	100	100	-

niger et la moelle. Pour le putamen et le noyau caudé, il en sera de même au niveau de l' α -globuline de mobilité 914. Pour le péduncule cérébelleux moyen, le pied du péduncule cérébral et le cortex temporal, toutes les γ -globulines ne sont pas présentes à 100 %. Enfin, la fréquence d'apparition des α -globulines de mobilités 914 et 697 sont basses pour la substance blanche périventriculaire et la corne d'Ammon. Si on excepte le centre ovale, les cortex insulaire, frontal ascendant et des première et deuxième frontales difficilement classables selon ces critères, on constate que toutes les structures extrapyramidales sous-corticales et la moelle sont caractérisées par la pré-

sence à 100 % de l'albumine, de l' α -globuline de mobilité 697 et des quatre γ -globulines. Sauf pour la partie ventrale de la protubérance, le cortex cérébelleux et la moelle, l' α -globuline de mobilité 846 y est également présente à 100 %. Si l'on considère les variations de la première préalbumine et de l' α -globuline de mobilité 914, on pourrait même avancer que cette dernière est en quelque sorte spécifique du noyau dentelé, du pallidum, du locus niger et de la moelle et la première préalbumine du putamen et du noyau caudé. Seuls les parties ventrale et dorsale de la protubérance, le thalamus, la substance blanche et le cortex cérébelleux présenteraient simultanément ces deux fractions (tabl. XXVIII). Voir une telle spécificité dans la localisation est tentant, quoique aventureux actuellement.

3. Concentrations.

Sauf pour le cortex cérébelleux, la concentration moyenne en protéines hydrosolubles dans les extraits cérébraux étant de l'ordre de 20 mg par millilitre, on peut avec une marge d'erreur assez restreinte comparer les résultats obtenus selon les localisations pour un taux arbitraire de 100 mg de protéines par exemple (tabl. XXIX et XXIX *bis*). Toutefois, ceux-ci — ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer — seront sujets à caution au niveau des zones α -lente et β du fait de la présence pour ainsi dire inévitable de l'hémoglobine. Uniquement à ce niveau doit être relevé dans les extraits de moelle, le taux extrêmement important (38,1 %) de l' α -globuline de mobilité 914 associé à l'absence constante de celle de mobilité 846. Nous n'avons pas retrouvé l'augmentation croissante du taux de l'albumine décrite par Palladin dans toutes les structures s'étageant entre le cortex et la périphérie. Cela doit tenir à la différence des techniques employées, la nôtre entraînant une fragmentation beaucoup plus grande. En effet, si l'on additionne ce que nous appelons albumine et α -globuline de mobilité 914, les chiffres obtenus montrent une certaine progressivité des structures blanches telles que pied du pédoncule cérébral, pédoncule cérébelleux moyen, partie dorsale du mésencéphale, partie ventrale et dorsale du pont, corps calleux et substance blanche du cervelet (10 à 13 %) au cortex cérébelleux, hippocampique, occipital, temporal, frontal ascendant et des première et deuxième frontales (14 à 15 %) aux cortex insulaire, orbitaire, au locus niger, pallidum et noyau caudé (16 à 19 %). Au delà, nous pouvons encore distinguer plusieurs autres groupes. D'abord, cortex callosomarginal, centre ovale, hypothalamus, noyau rouge, putamen et noyau dentelé où ces concentrations atteignent 20 à 21 %. Ensuite, thalamus, substance blanche périventriculaire et corne d'Ammon (21

TABLEAU XXIX

Concentration en % (zones préalbumines, albumine et α globulines)														
	Nb	1332	1277	1332/1277	1198	1133	1069	1003	914	840	770	697	613	523
Pied du pédoncule	1	0,4	-	0,4	3,1	-	3,8	7,3	3,4	7,3	6,5	5,0	11,8	5,7
Pédoncule cérébelleux moyen	1	-	-	-	-	6,4	3,8	8,1	3,6	6,3	5,4	9,0	-	7,3
Corps calleux	1	-	-	-	-	2,0	4,4	7,9	5,3	6,1	10,5	11,4	-	7,9
Centre ovale	4	-	0,1	0,1	1,7	1,7	4,9	12,5	7,6	7,6	7,3	11,8	-	9,5
Subst. bl. périvent.	4	1,1	0,1	1,1	0,8	2,7	4,1	15,6	5,9	7,8	7,6	7,8	-	-
Subst. bl. cervelet	3	-	0,7	0,7	1,0	-	6,0	8,7	3,9	5,0	5,5	6,8	-	5,4
P. dors. mésencéphale	1	-	0,3	0,3	2,0	-	3,4	9,3	3,1	6,5	3,1	4,5	6,8	5,5
P. ventrale pont	1	-	-	-	2,1	-	3,5	7,0	2,8	5,5	4,1	5,5	3,5	7,0
P. dorsale pont	1	-	0,7	0,7	2,9	-	4,2	9,1	2,6	6,2	3,9	5,9	-	-
Moelle	5	-	0,6	0,6	2,3	-	3,9	8,2	38,0	-	7,4	5,7	-	5,2
Nerf	4	-	-	-	1,1	-	-	52,6	-	8,9	-	-	5,9	7,0
Cortex orbitaire	1	2,4	-	2,4	2,4	-	5,9	11,2	7,6	5,9	6,4	10,0	-	7,0
- Fa	3	0,7	1,6	2,3	-	4,1	3,6	8,3	6,0	8,1	9,1	8,7	-	12,6
- F ₁ F ₂	3	-	0,7	0,7	-	-	4,4	9,0	5,6	5,5	5,9	6,5	-	7,1
- insulaire	5	-	1,0	1,6	-	2,4	3,8	11,2	6,4	8,5	6,5	8,5	-	7,1
- temporal	1	-	0,8	0,8	1,3	-	4,0	7,9	5,0	5,3	-	12,1	-	-
- callosomarginal	1	-	0,3	0,3	-	-	3,3	13,4	7,2	5,9	5,2	12,7	-	11,8
- hippocampique	2	-	0,4	0,4	0,8	1,8	4,8	9,0	5,1	5,2	5,6	7,4	-	7,0
Noyau amygdale	1	-	-	-	-	-	-	16,6	10,9	-	13,1	12,0	-	8,0
Corne d'Ammon	5	1,0	0,9	1,9	-	2,1	-	11,9	9,1	8,1	6,3	9,5	-	9,8
Cortex occipital	3	0,5	-	0,7	-	4,1	2,9	9,0	5,4	-	7,5	8,7	-	8,7
Corps genouillé ext.	1	-	0,0	-	-	3,4	5,1	7,4	5,1	7,4	6,8	11,4	-	-
Cortex cérébelleux	4	1,4	1,9	3,3	-	4,1	4,5	9,6	5,3	6,3	6,0	6,1	-	5,4
Thalamus	2	-	0,2	0,2	-	2,0	3,7	15,1	7,8	8,5	-	15,7	-	-
Noyau caudé	5	-	1,3	1,3	-	-	3,7	11,3	6,2	9,5	6,3	7,5	-	9,0
Putamen	5	-	0,9	0,9	-	3,2	-	14,5	5,6	6,6	5,0	9,0	-	7,3
Pallidus	4	-	0,6	0,6	0,7	3,7	4,5	12,6	4,7	7,1	5,4	7,4	-	7,9
Noyau rouge	1	-	-	-	-	5,2	-	14,8	5,2	4,7	5,8	5,8	-	7,6
Locus niger	3	-	0,9	0,9	3,1	2,3	4,0	12,7	3,6	5,9	5,6	4,9	-	6,7
Locus caeruleus	1	-	-	-	-	1,9	-	12,1	2,2	3,0	3,2	5,1	-	-
Noyau dentelé	4	0,0	-	0,0	-	-	5,7	12,5	8,0	5,0	7,2	4,6	-	7,9
Hypothalamus	1	-	0,4	0,4	-	3,8	-	15,1	4,8	4,3	4,3	8,2	-	6,2

TABLEAU XXIXbis

Concentrations en % (zones β et γ globulines)											
	Nb	445	406	319	214	114	72	114/72	23	-15	23/-15
Pied du pédoncule	1	24,0	-	6,1	5,0	4,6	-	4,6	3,8	2,2	6,0
Pédoncule cérébelleux moyen	1	25,3	6,3	5,4	4,5	5,4	-	5,4	3,6	1,8	5,4
Corps calleux	1	5,3	14,0	6,1	5,3	5,3	4,4	9,7	-	3,5	3,5
Centre ovale	4	25,6	10,0	5,8	3,9	4,7	-	4,7	4,4	3,6	8,0
Subst. bl. périvent.	4	25,2	9,5	5,3	4,2	4,6	-	8,3	4,3	2,3	6,6
Subst. bl. cervelet	3	30,3	14,4	5,6	4,7	5,3	4,1	9,4	2,8	2,9	5,7
P. dors. mésencéphale	1	22,8	15,8	5,1	3,4	2,0	1,7	3,7	2,3	2,5	4,8
P. ventrale pont	1	35,0	-	6,2	6,9	2,1	4,1	6,2	-	3,5	3,5
P. dorsale pont	1	31,8	14,6	5,9	3,3	2,0	2,3	4,3	2,3	2,0	4,3
Moelle	5	16,0	-	3,9	3,4	3,1	3,1	6,2	2,4	2,2	4,7
Nerf	4	6,7	10,4	3,9	2,7	2,6	1,7	4,3	1,7	-	1,7
Cortex orbitaire	1	26,3	-	6,4	3,5	1,7	-	1,7	2,9	-	2,9
- Fa	3	-	23,4	5,5	3,7	2,3	-	2,3	-	-	-
- F ₁ F ₂	3	30,7	23,0	3,7	2,3	2,1	-	2,1	-	2,1	2,1
- insulaire	5	28,8	26,1	4,6	4,3	2,6	-	2,6	-	2,6	2,6
- temporal	1	49,9	-	4,7	4,0	2,9	-	2,9	-	2,1	2,1
- callosomarginal	1	-	22,5	6,2	5,6	-	2,9	2,9	-	3,3	3,3
- hippocampique	2	35,0	4,0	5,0	4,0	2,2	-	2,2	1,5	1,0	2,5
Noyau amygdale	1	13,7	6,9	6,3	5,1	3,4	-	3,4	1,7	1,7	3,4
Corne d'Ammon	5	33,7	12,8	4,8	3,8	1,6	-	1,6	2,0	2,2	4,2
Cortex occipital	3	25,8	8,7	5,8	4,1	1,9	-	1,9	-	1,4	1,4
Corps genouillé ext.	1	24,4	-	6,8	6,2	5,7	-	5,7	5,7	4,0	9,7
Cortex cérébelleux	4	27,4	12,7	5,3	3,0	1,9	-	1,9	1,5	0,8	2,3
Thalamus	2	26,2	6,2	8,0	6,7	2,4	-	2,4	3,2	-	3,2
Noyau caudé	5	29,9	26,7	6,4	3,4	2,1	-	2,1	1,8	1,4	3,2
Putamen	5	22,9	28,7	4,5	4,1	2,3	-	2,3	3,2	2,6	5,8
Pallidum	4	41,1	16,2	5,0	3,9	2,3	0,6	2,9	1,5	2,8	4,3
Noyau rouge	1	24,8	8,2	7,2	5,2	2,3	-	2,3	1,7	1,7	3,4
Locus niger	3	30,3	13,7	4,1	3,7	3,1	-	3,1	1,4	2,4	3,8
Locus caeruleus	1	51,6	11,1	3,5	2,4	1,4	-	1,4	1,4	1,1	2,5
Noyau dentelé	4	25,2	18,1	7,2	3,9	3,5	-	3,5	2,0	2,7	4,7
Hypothalamus	1	36,5	-	5,8	4,8	2,9	-	2,9	3,3	-	3,3

à 23 %). Enfin, trois dernières valeurs : celle du noyau de l'amygdale (27 %) et celles, très isolées, de la moelle (46 %) et du nerf (52 %).

Par ailleurs, le taux des préalbumines totales sera élevé dans les cortex cérébelleux, insulaire et frontal (12 à 13 %) et à un degré moindre dans le cortex orbitaire et les noyaux gris de la base (10 à 12 %). Inférieur pour toutes les autres localisations, il sera presque nul au niveau de l'amygdale. Si l'on considère la zone γ , on trouve qu'elle est toujours importante dans toutes les structures blanches (substance blanche du cervelet, pédoncule cérébelleux moyen, pied du pédoncule cérébral, partie ventrale de la protubérance, corps calleux,

TABLEAU XXX

Concentrations moyennes des fractions protéiques solubles ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais)																
	Nb	1332/1277	1198	1133	1069	1003	914	846	770	697	523	445	400	319	214	114/72 23/-15
Pied du pédoncule	1	40	300	-	380	730	340	730	650	500	570	2400	-	610	500	460 600
Centre ovale	4	15	120	250	290	950	650	520	730	750	730	2020	790	360	260	360 580
Subst. bl. Périvent.	3	-	-	150	360	800	400	480	530	660	-	1700	-	390	260	540 500
Subst. bl. cervelet	3	40	60	-	540	920	380	580	550	660	560	2581	1540	550	490	740 720
Moelle	5	30	140	-	330	730	3240	-	-	490	500	1500	-	320	300	250 180
Cortex Fa	3	260	-	300	340	700	520	610	680	740	-	1150	1950	420	310	200 -
- F ₁ F ₂	3	90	-	-	340	700	430	460	430	480	490	2700	1600	250	150	130 130
- insulaire	5	170	-	210	440	1060	560	620	640	760	720	2530	2960	400	380	230 500
Corne d'Ammon	4	60	-	200	-	1040	630	830	560	760	870	3960	1800	470	350	180 370
Cortex cérébelleux	4	540	-	-	920	1450	880	1230	980	1270	820	5450	2320	770	390	280 420
Noyau caudé	5	130	180	300	500	1130	630	950	620	680	880	2780	3600	670	330	190 290
Putamen	5	100	-	330	420	1140	600	720	710	940	660	2680	3250	490	420	240 580
Pallidum	4	50	-	320	410	1130	460	700	500	820	730	3780	1310	430	360	260 250
Locus niger	3	120	-	230	460	1330	410	620	600	500	690	2930	1520	400	370	300 340
Noyau dentelé	3	30	-	-	660	1320	690	590	760	580	720	3930	2180	860	480	270 620

centre ovale, substance blanche périventriculaire) ainsi que dans le thalamus, le noyau dentelé et le corps genouillé latéral (19 à 28 %). Pour les autres localisations, le taux des γ -globulines totales oscille entre 14 et 18 %. Les valeurs les plus basses seront celles du cortex cérébelleux (12 %) et du *locus caeruleus* (10 %).

Compte tenu du taux de matière sèche, on retrouverait évidemment ces mêmes dispositions dans les résultats exprimés en microgrammes par gramme de tissu frais (tabl. XXX).

A ce sujet, il convient de rappeler les travaux de Wieme sur le complexe haptoglobine-hémoglobine. Normalement dans le sérum, la fraction haptoglobine a une mobilité de 668 ($\sigma = \pm$) en agar. La mobilité du complexe haptoglobine/hémoglobine diminue progressivement pour atteindre 613 ($\sigma = \pm 33$) lorsque l'haptoglobine est complètement saturée. Si le taux de l'hémoglobine est plus important, il y a apparition d'une fraction dans la zone β (nr 460— $\sigma = \pm 10$) et même dans

la zone γ (mr 240— $\sigma = \pm 10$). La contamination importante des extraits par le sang explique que l'on doit considérer les résultats des zones α lente et β du tableau page 00 avec beaucoup de circonspection.

3. Éléments minéraux.

A. Concentrations en éléments minéraux du tissu nerveux :

Bien que les travaux de Ter Meulen, de Bertrand permettent de lui attribuer dans l'organisme un taux moyen de 0,08 microgramme pour 100 mg de matière sèche, le molybdène n'a jamais été mis en évidence par la technique employée. Ceci ne tient pas à la sensibilité de la méthode puisque l'on peut détecter 0,003 microgramme d'argent

TABLEAU XXXI

	Taux des éléments minéraux ($\mu\text{g}/100$ mg de matière sèche)									
	Cu		Fe		Ag		Mg		Co	
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Cortex cérébelleux	2	4,7	3	18,2	2	0,454	3	171	3	9,2
Pellidum	4	2,6	2	43,0	3	0,170	4	117	2	11,4
Putamen	4	2,8	4	44,1	1	0,460	4	116	2	12,3
Noyau caudé	5	4,4	5	24,7	4	0,570	5	154	2	5,8
Corne d'Ammon	5	2,6	4	16,9	2	0,187	5	156	2	9,3
Cortex Pa	2	4,5	2	14,7	2	0,122	2	142	1	10,6
Cortex F ₁ F ₂	5	3,5	5	17,9	3	0,096	5	136	3	13,6
Cortex insulaire	5	2,6	5	12,0	1	0,022	5	132	2	9,6
Centre ovale	6	1,9	6	10,3	4	0,038	6	111	5	13,3
Subst. bl. périvent.	5	2,4	5	9,7	5	0,061	5	116	3	11,1
Moelle	3	0,8	3	1,6	2	0,205	2	78	2	13,2
Total des cas	46		44		29		46		27	
Chiffre minimum		0,9		0,6		0,003		60		5,8
- maximum		7,3		70,3		1,150		238		20,5

mais plutôt, croyons-nous, au mode de calcination. Quoi qu'il en soit, si l'on considère nos résultats exprimés en μg pour 100 mg de matière sèche (tabl. XXXI), on constate : une distribution assez uniforme du cuivre, du magnésium, du cobalt, du zinc, du manganèse et du phosphore ; une nette augmentation de la teneur en fer du noyau lenticulaire. Ces faits, bien que nos chiffres pour le cuivre soient légèrement inférieurs à ceux de Thompson et de Cumings, coïncident très bien avec les conclusions de Cartwright et de Löwenthal. Ce tableau toutefois montre aussi d'autres particularités : au niveau de la moelle, une diminution légère des teneurs en magnésium et en phosphore et beaucoup plus marquée pour celles en cuivre et en fer ; une assez nette augmentation de l'argent dans le cortex cérébelleux et le striatum ; enfin, surtout, une forte teneur en aluminium du noyau caudé.

Ces données sont d'ailleurs bien extériorisées lorsque les résultats sont exprimés en μg par gramme de tissu frais (tabl. XXXII).

Si l'on aborde le problème de la teneur en éléments minéraux du

TABLEAU XXXII

	Taux des éléments minéraux (μg /gramme de tissu frais)									
	Cu		Fe		Ag		Ni		Co	
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Cortex cérébelleux	2	11,2	3	43,3	2	1,010	3	39,7	3	22,1
Pallidum	3	7,4	2	129,5	2	0,874	3	35,9	1	38,9
Putamen	4	8,1	4	120,6	1	1,513	4	33,2	2	3,4
Noyau caudé	5	10,0	5	58,9	4	1,332	5	36,1	2	14,9
Corne d'Ammon	5	6,5	4	38,9	2	0,694	5	38,0	2	14,9
Cortex Fa	2	11,1	2	30,9	2	0,304	2	30,1	1	25,7
Cortex F ₁ F ₂	5	9,2	5	45,1	3	0,255	5	35,1	3	30,5
Cortex insulaire	5	6,7	5	29,0	1	0,045	5	32,9	2	21,1
Centre ovale	6	5,8	6	28,0	4	0,105	6	32,0	5	43,2
Subst. bl. périvent.	5	8,1	5	31,7	5	0,205	5	36,2	3	39,3
Moelle	3	2,7	3	5,5	2	0,641	2	24,8	2	41,1
Total des cas	45		43		28		45	26	24	19
Chiffre minimum		1,6		2,4		0,009		188		11,3
- maximum		20,5		203,7		3,000		599		58,2

TABLEAU XXXIII

	Taux des métaux en atome-gramme							
	$\times 10^{-6}$				$\times 10^{-10}$			
	pour 100 mg M.S.		pour 1 g t. frais		pour 100 mg M.S.		pour 1 g t. frais	
	Mg	P	Mg	P	Ag	Ag	Ag	Ag
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Cortex cervelet	3	7,0	2	27,0	3	16,4	2	64,4
Pallidum	4	4,8	2	23,0	3	14,7	2	89,8
Putamen	4	4,8	2	19,7	4	13,8	2	63,1
Noyau caudé	5	6,2	5	23,7	5	14,8	5	55,4
Corne d'Ammon	5	6,4	5	24,9	5	15,9	5	64,5
Cortex Fa	2	5,8	1	25,3	2	14,9	1	67,7
Cortex F ₁ F ₂	5	5,6	3	23,0	5	14,4	3	63,1
Cortex insulaire	5	5,4	3	24,8	5	13,5	3	65,4
Centre ovale	6	4,6	5	27,5	6	13,4	5	81,5
Subst. bl. périvent.	5	4,8	4	24,8	5	15,7	4	82,6
Moelle	2	3,2	3	19,2	2	10,2	3	61,6
Total des cas	46		35		45		35	
Chiffre minimum		2,5		15,1		7,7		34,0
- maximum		9,8		41,8		24,7		112,0

système nerveux sous un autre angle — concentrations en atome-gramme — il est évident que l'on peut envisager trois grands groupes. Le premier de concentration « 10^{-6} » répond au magnésium et au phosphore. Le second de concentration « 10^{-8} » au cuivre, fer,

cobalt, zinc, manganèse et aluminium. Enfin, l'argent dans celui de concentration « 10^{-10} » (tabl. XXXIII, XXXIV et XXXV). En plus de l'illustration de la notion d'éléments majeurs et d'oligo-éléments, ce mode de classification donne une idée beaucoup plus

TABLEAU XXXIV

	Taux des éléments minéraux (atome gramme $\times 10^{-8}$ / 100 mg matière sèche)											
	Cu		Fe		Co		Zn		Mn		Al	
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Cortex cérébelleux	2	7,3	3	32,7	3	15,6	3	7,0	1	1,3	2	18,5
Pallidum	4	4,1	2	77,2	2	19,3	2	8,7	2	2,0	3	9,4
Putamen	4	4,4	4	79,1	2	20,8	2	9,3	2	2,2	3	11,5
Noyau caudé	5	6,9	5	44,4	2	9,8	2	4,4	1	1,1	5	91,1
Corne d'Ammon	5	4,1	4	30,3	2	15,8	2	7,1	1	2,0	4	27,5
Cortex Fa	2	7,0	2	26,4	1	17,9	1	8,3	1	1,8	2	23,3
Cortex F ₁ F ₂	5	5,4	5	31,9	3	22,9	2	9,8	3	2,4	2	18,8
Cortex insulaire	5	4,1	5	21,5	2	16,2	2	7,3	2	1,7	2	19,7
Centre ovale	6	3,1	6	18,4	5	22,5	4	8,8	3	3,0	6	17,5
Subst. bl. périvent.	5	3,8	5	17,4	3	18,7	3	8,4	2	2,2	4	31,0
Noëlle	3	1,2	3	3,0	2	22,4	2	10,2	2	2,4	3	26,2
Total des cas	46		44		27		25		20		36	
Chiffre minimum		1,4		1,4		9,8		4,4		1,1		3,4
- maximum		11,4		126,5		34,7		11,7		3,7		188,0

TABLEAU XXXV

	Taux des éléments minéraux (atome gramme $\times 10^{-8}$ / gramme de tissu frais)											
	Cu		Fe		Co		Zn		Mn		Al	
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Cortex cérébelleux	2	17,6	3	77,8	3	37,3	3	16,8	1	2,7	2	46,1
Pallidum	3	11,7	2	232,2	1	98,0	1	44,2	1	10,2	2	22,6
Putamen	4	12,7	4	216,1	2	59,1	2	26,7	2	6,1	3	35,4
Noyau caudé	5	15,7	5	105,7	2	25,3	2	11,4	1	3,5	5	194,3
Corne d'Ammon	5	10,2	4	69,6	2	50,7	2	22,8	1	7,5	4	62,9
Cortex Fa	2	17,5	2	66,3	1	43,4	1	20,0	1	4,7	2	59,8
Cortex F ₁ F ₂	5	14,4	5	80,8	3	51,6	2	24,1	3	5,4	2	42,1
Cortex insulaire	5	10,5	5	53,1	2	35,7	2	16,1	2	3,7	2	40,3
Centre ovale	6	9,1	6	50,2	5	73,2	4	30,8	3	9,9	6	41,6
Subst. bl. périvent.	5	12,3	5	56,8	3	66,6	3	30,0	2	8,0	4	97,7
Noëlle	3	6,4	3	9,8	2	69,6	2	31,9	2	7,4	3	84,5
Total des cas	45		44		26		24		19		35	
Chiffre minimum		2,5		4,3		19,1		8,7		2,7		7,8
- maximum		32,2		365,0		98,0		44,2		10,2		342,0

exacte de l'ordre de grandeur des concentrations respectives des divers éléments dans le système nerveux.

Pour terminer, nous signalerons que nous avons rapporté à titre indicatif les taux du cobalt, du zinc et du manganèse, car ils doivent tous être précédés du symbole « $<$ », ce qui, évidemment, restreint leur signification.

B. Concentrations en éléments minéraux des extraits et des culots de centrifugation du tissu nerveux.

Le premier point important à souligner est l'impossibilité dans les extraits cérébraux de mettre en évidence quatre métaux : le molybdène évidemment, mais aussi le cobalt, le zinc et le manganèse. Les autres éléments apparaissent chacun avec des fréquences différentes. Dans les dix-huit extraits étudiés dans ce sens (tabl. XXXVI), le fer, le magnésium et le phosphore étaient toujours présents, tandis que la fréquence d'apparition se révélait moindre pour le cuivre (83 %), l'aluminium (77 %) et surtout l'argent (39 %). Par ailleurs, la solution de saccharose 0,25 M ayant servi pour ces extraits présentait

TABLEAU XXXVI

	Concentrations des extraits en éléments minéraux ($\mu\text{g/ml}$)											
	Cu		Fe		Ag		Ng		Al		P	
	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T	Nb	T
Solution saccharose 0,25 M	-	-	1	0,25	-	-	2	0,72	-	-	-	-
Cortex	3	2,3	4	48,30	2	0,001	4	55,00	2	7,1	4	297
Substance blanche	2	1,6	3	19,50	1	0,005	3	27,00	2	5,1	3	293
Noyau caudé	1	1,2	1	6,20	-	-	1	146,00	1	29,2	1	312
Pallidum	2	3,3	2	4,90	-	-	2	170,00	2	8,8	2	417
Putamen	3	5,6	3	10,80	1	0,103	3	262,00	3	20,3	3	494
Corne d'Ammon	2	5,8	2	11,30	1	2,222	2	198,00	1	4,8	2	446
Moelle	1	2,1	1	6,00	1	0,428	1	112,00	1	10,7	1	294
Axe gris médullaire	1	10,7	1	5,90	1	0,830	1	202,00	1	101,2	1	298
Cordons médullaires	-	-	1	5,80	-	-	1	79,00	1	1,8	1	212
Total des cas	45		18		7		18		14		18	
Chiffre minimum		1,2		2,50		0,005		12,00		1,8		212
- maximum		11,1		68,50		2,222		432,00		101,2		590
Fréquence d'apparition		83%		100%		39%		100%		77%		100%

en fin d'expérience des taux infimes de fer et de magnésium n'influençant pour ainsi dire pas les résultats définitifs. L'examen de ces derniers montre également des particularités intéressantes : au niveau de l'axe gris médullaire, une augmentation du cuivre et de l'aluminium, ce dernier élément étant aussi prépondérant, mais à un degré moindre, dans le striatum comme nous l'avons déjà vu pour le tissu ; au niveau du cortex et de la substance blanche, une augmentation de la teneur en fer et des valeurs plus faibles pour le magnésium ; une légère augmentation du phosphore pour les extraits du noyau lenticulaire et de la corne d'Ammon.

Enfin, un fait négatif important à noter est, contrairement aux résultats obtenus pour le tissu, la teneur en fer nullement augmentée dans les extraits des noyaux de la base. Ceci permet d'avancer que cet excès ferrique est localisé dans les éléments figurés cellulaires, très vraisemblablement les mitochondries.

TABLEAU XXXVII

Valeurs théoriques des taux des éléments minéraux ($\mu\text{g/g}$. t. frais - c = culot, e = extrait, t = tissu).

		Cu	Fe	Ag	Mg	Co	Zn	Mn	Al	P
Cortex	c	5,8	19,3	1,929	229,3	39,7	19,8	3,9	15,4	2443
	e	1,4	32,2	0,017	55,5	-	-	-	1,7	151
	t	7,2	51,5	1,946	284,8	39,7	19,8	3,9	17,1	2594
Noyau caudé	c	10,7	28,4	-	270,9	-	-	-	25,2	1827
	e	0,8	4,0	-	94,7	-	-	-	18,9	2029
	t	11,5	32,4	-	365,6	-	-	-	44,1	2029
Pallidum	c	21,7	29,9	15,106	391,6	37,3	18,6	3,7	33,6	3095
	e	2,1	2,1	-	97,7	-	-	-	4,3	217
	t	23,8	32,0	15,106	489,3	37,3	18,6	3,7	37,9	3313
Putamen I	c	8,9	32,9	1,529	258,5	27,8	13,9	2,8	-	2474
	e	1,3	2,7	-	254,8	-	-	-	18,7	348
	t	10,2	35,6	1,529	513,3	27,8	13,9	2,8	18,7	2822
Putamen II	c	4,7	31,5	2,358	423,3	-	-	-	47,1	3865
	e	3,3	1,6	-	50,1	-	-	-	10,0	133
	t	8,0	33,1	2,358	473,4	-	-	-	57,1	3998
Corne d'Ammon I	c	12,3	14,1	1,292	391,1	70,8	35,4	7,0	16,9	3628
	e	1,9	3,7	0,977	48,8	-	-	-	-	183
	t	14,2	17,8	2,269	439,9	70,8	35,4	7,0	16,9	3811
Corne d'Ammon II	c	8,9	13,8	10,944	355,2	51,0	25,5	5,1	10,8	2615
	e	2,5	5,1	-	102,9	-	-	-	1,7	171
	t	11,4	18,9	10,944	458,1	51,0	25,5	5,1	12,5	2786
Noëlle	c	-	3,8	0,436	182,3	38,8	19,4	3,8	7,3	1967
	e	1,0	3,0	0,214	56,0	-	-	-	8,3	147
	t	1,0	6,8	0,650	238,3	38,8	19,4	3,8	15,6	214
Axe gris méd.	c	-	9,1	17,290	418,6	-	-	-	91,0	4277
	e	5,7	3,2	0,448	109,0	-	-	-	54,6	160
	t	5,7	12,3	17,738	527,6	-	-	-	145,6	4437
Cordons médul.	c	-	12,7	0,966	205,6	38,6	19,3	3,8	5,2	2266
	e	-	3,3	-	45,9	-	-	-	1,0	122
	t	-	16,0	0,966	251,5	38,6	19,3	3,8	6,2	2388

TABLEAU XXXVIII

Comparaisons des valeurs théoriques et expérimentales ($\mu\text{g/gramme}$ tissu frais)

	Cortex		Noyau caudé		Pallidum		Putamen		Corne d'Ammon		Noëlle	
Cu	e	3,6	-	20,5	e	4,4	-	13,2	e	5,2	-	10,0
	t	7,2			t	11,5			t	23,8		
Fe	e	21,2	-	82,1	e	55,4	-	203,7	e	6,9	-	11,4
	t	51,5			t	32,0			t	10,2		
Ag	e	0,082	-	0,590	e	0,187	-	1,562	e	49,0	-	163,5
	t	1,946			t	15,106			t	34,6		
Mg	e	260	-	481	e	298	-	452	e	1,513		2,269
	t	284			t	365			t	1,500		2,300
Co	e	26,6	-	36,6	e	58,2			e	188	-	581
	t	39,7			t	37,3			t	513		473
Zn	e	13,3	-	18,2	e	28,9			e	29,0	-	41,0
	t	19,8			t	18,6			t	27,8		
Mn	e	2,6	-	3,5	e	5,6			e	14,5	-	20,4
	t	3,9			t	3,7			t	13,9		
Al	e	9,8	-	13,0	e	4,1	-	8,1	e	2,8	-	3,9
	t	17,1			t	37,9			t	2,8		
P	e	1723	-	2287	e	2357	-	3220	e	2,1	-	21,0
	t	2594			t	3312			t	18,7		
									t	57,1		
									t	1785	-	2135
									t	2822		
									t	3198		
									t	1618	-	2910
									t	3811		
									t	2786		

Par ailleurs, la somme des taux d'un élément minéral dans l'extrait et le culot de centrifugation doit théoriquement égaler celui trouvé pour le tissu. Connaissant le poids et le volume d'extrait recueilli, le poids du tissu utilisé, du culot et son pourcentage en matière sèche, il est aisé de ramener toutes ces données au gramme de tissu frais. Ces résultats permettent donc de calculer par simple addition les valeurs théoriques pour le tissu considéré (tabl. XXXVII). Sauf pour le fer et l'argent dont on connaît les grandes variations, sauf également pour le pallidum qui devait être pathologique bien que macroscopiquement rien ne l'indiquait, ces valeurs théoriques coïncident assez bien avec celles obtenues expérimentalement (tabl. XXXVIII où e =valeur expérimentale et t =valeur théorique).

II. — Cas pathologiques

1. Lacticodéshydrogénase.

A. LDH totale.

Dans le premier sous-chapitre « cas normaux », nous avons vu que l'activité lacticodéshydrogénasique totale n'était pas uniforme dans le système nerveux mais, selon la localisation, variait toutefois entre des limites précises. Etudiant six cas de pathologie nerveuse simple selon cet optique, nous sommes arrivés à des résultats qu'il est intéressant de mettre en parallèle avec l'examen macroscopique.

1. Les faits :

a) Cas Pet... (I.B. 4/62). Hémorragie sous arachnoïdienne grave, inondation ventriculaire de moyenne abondance, épaisse lame de sang coagulé engainant la portion ventrale du tronc cérébral avec foyers nécrotiques de ce dernier chez un malade traité par les anticoagulants.

L'activité lacticodéshydrogénasique, très légèrement augmentée au niveau du cortex frontal, l'est au maximum dans la zone — la corne d'Ammon — proche des lésions principales (fig. 12).

b) Cas Ven... (I.B. 3/62). Gros foyer ancien de ramollissement dans la capsule interne et petits foyers plus récents corticaux chez un artérioscléreux.

Ces lésions se traduisent par une baisse de l'activité enzymatique dans les cortex frontal, insulaire et au niveau du pallidum (fig. 13).

c) Cas Spi... (I.B. 135/61). Etat congestif des deux hémisphères avec œdème du tronc cérébral chez un malade dont on ignore tout de la symptomatologie clinique.

Si l'activité lacticodéshydrogénasique est à la limite de la normale pour le centre ovale et la corne d'Ammon, elle est très considérablement augmentée au sein de la substance blanche périventriculaire (fig. 14).

Cas Pe...

Syndrôme hémorragique
après anticoagulants

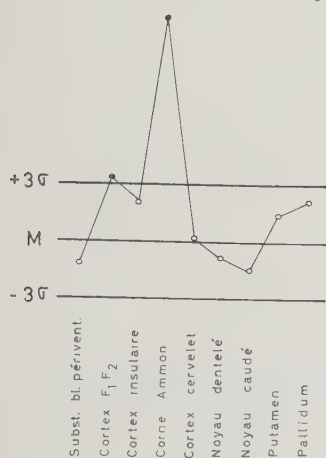


FIG. 12.

Cas Ve...

Ramollissement ancien capsule
interne. Petits ramollissements
corticaux.

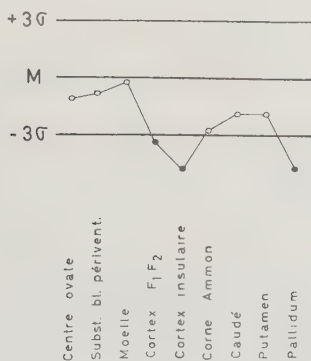


FIG. 13.

Cas Spe...

Cerveau congestif
Oedème franc.

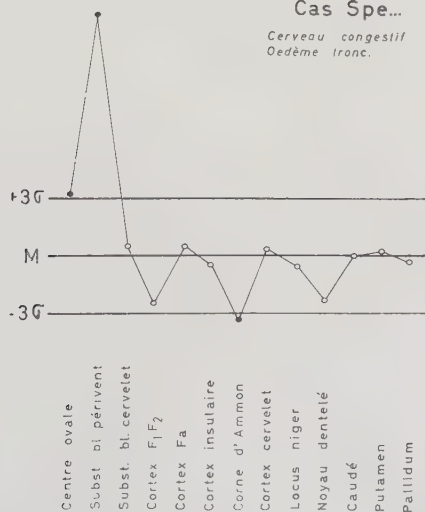


FIG. 14.

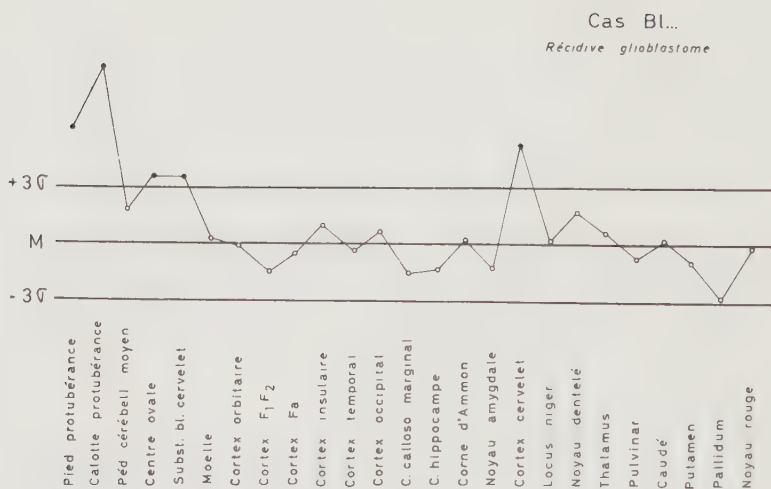


FIG. 15.

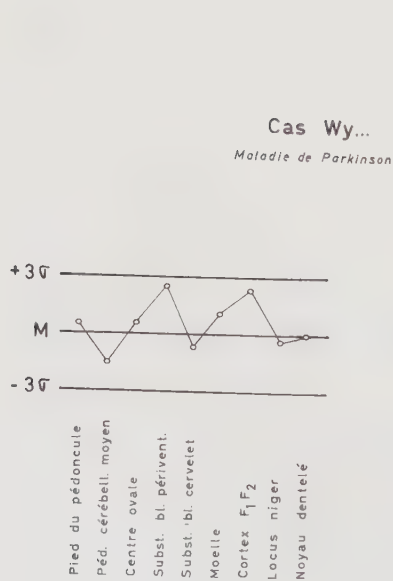


FIG. 16.

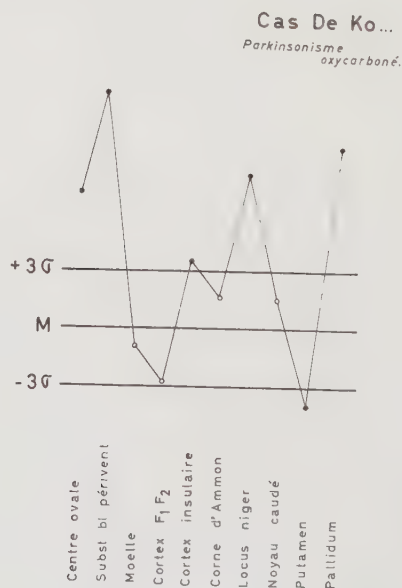


FIG. 17.

d) Cas Blo... (I.B. 136/61). Œdème cérébral important et diffus avec signe d'engagement et foyers de nécrose hémorragique du pont chez une malade présentant une récurrence de glioblastome rétrorolandique.

L'activité enzymatique, légèrement augmentée au sein du centre ovale et de la substance blanche du cervelet, l'est bien plus nettement au niveau du cortex cérébelleux et de la totalité de la protubérance (fig. 15).

e) Cas Wuy... (I.B. 133/61). Maladie de Parkinson avec la dépigmentation habituelle du locus niger.

L'activité lactico-déshydrogénasique est, pour ce cas, entièrement normale, du moins dans les localisations examinées (fig. 16).

f) Cas Dek... (I.B. 143/61). Congestion vasculaire importante du centre ovale, grisâtre de façon diffuse et légèrement œdématisé; engagement des amygdales cérébelleuses, absence de signes de nécrose du noyau lenticulaire chez une malade présentant un état parkinsonien à la suite d'une intoxication oxycarbonée.

Si l'activité enzymatique est un peu élevée dans le cortex insulaire et diminuée dans le putamen, elle traduit par ses très nettes modifications les grandes zones lésionnelles décrites depuis longtemps dans l'intoxication oxycarbonée. Fortement augmentée au sein du centre ovale, elle l'est bien plus encore dans la substance blanche périventriculaire pour atteindre son maximum au niveau du pallidum. Cette dernière augmentation est d'autant plus importante — ainsi, d'ailleurs, que la diminution au sein du putamen — qu'aucune lésion n'est macroscopiquement discernable au niveau du noyau lenticulaire. Parallèlement, il convient de faire remarquer l'élévation importante de l'activité enzymatique dans le locus niger que les neuropathologistes ne mentionnent généralement pas comme lésé dans ce type d'intoxication (fig. 17).

2. Conséquences de ces faits.

En considérant l'ensemble de ces résultats, rassemblés dans le tableau XXXIX, on constate que « l'œdème » ou « l'état congestif » se traduit uniformément dans tous les types de substance blanche par une augmentation plus ou moins importante de l'activité lactico-déshydrogénasique.

Dans les structures grises profondes, cette dernière, si elle est très nettement augmentée au niveau des lésions anoxiques du locus niger et du pallidum de l'intoxication oxycarbonée, sera régulièrement basse dans les zones proches d'une atteinte patente macroscopiquement : le pallidum en cas de ramollissement capsulaire ancien, le putamen en cas d'intoxication oxycarbonée. Dans le cortex hémisphérique ou cérébelleux, l'activité enzymatique est toujours très peu au-dessus ou au-dessous des limites normales. Au-dessous en cas de ramollissement ou d'état congestif. Au-dessus, chaque fois qu'il y aura œdème diffus. Seule, une fois, la corne d'Ammon réagit intensément à la situation pathologique (cas Pet...).

TABLEAU XXXIX

	Activités L.D.H. (un. BÜcher / g de tissu frais)									
	Valeurs augmentées					Valeurs diminuées				
Cas	PET..	VEN..	SP1..	LL1..	LL2..	PET..	VEN..	SP1..	BLO..	DEK..
Centre ovale	x		930	960	1260	x				
Substance blanche périvent.			2540	x	2080				x	
Substance blanche cervelet	x	x		950	x	x	x			x
Pied protubérance	x	x	x	1200	x	x	x	x		x
Calotte protubérance	x	x	x	1440	x	x	x	x		x
Cortex F ₁ F ₂	1680						670			
Cortex insulaire					1090		680			
Corne d'Ammon	2720							660		
Cortex cérébelleux		x		1920	x		x			x
Putamen										740
Pallidum					3500		500			
Locus niger	x	x			2360	x	x			
	x = la détermination n'a pas été faite dans la localisation.									

B. Isozymes de la LDH.

L'activité des divers isozymes de la LDH est extrêmement sensible aux conditions pathologiques. Si l'on examine uniquement l'enzymogramme ou les pourcentages d'activité, comme nous l'avons fait dans le sous-chapitre précédent, cette sensibilité n'est pas évidente, sauf dans des cas très rares dont nous rapporterons un exemple tiré de la pathologie animale. Pour extérioriser cette hypersensibilité, il convient de considérer chaque isozyme séparément. Pour cela, il faut nécessairement comparer les différentes surfaces des courbes d'absorption, ce qui est possible puisque Wieme a montré que ces surfaces sont proportionnelles aux logarithmes des activités isozymiques réelles. Pour la facilité de l'exposé, nous avons préféré calculer pour une localisation donnée le rapport de la surface de la courbe de l'isozyme à la moyenne des surfaces de courbes du même isozyme dans les cas normaux, cette moyenne étant considérée comme activité unité de référence pour l'isozyme dans la localisation. Dans ces conditions, l'étude statistique des rapports obtenus pour chaque isozyme montre qu'ils peuvent être considérés comme présentant une activité normale lorsque leurs rapports sont répartis dans une zone ayant pour moyenne évidemment l'unité et pour écart type 0,08.

Dans les six cas pathologiques précédents, nous avons calculé essentiellement ces rapports au niveau des localisations présentant une activité enzymatique totale augmentée ou abaissée, mais aussi dans des localisations où cette dernière était normale bien que l'existence des lésions histologiques soit évidente.

1. Faits de pathologie humaine :

a) Cas Pe... (fig. 18). — Uniquement au niveau du cortex frontal, une hyperactivité des premier, deuxième et quatrième isozymes, hyperactivité à la vérité très proche de la normale pour ces deux derniers.

b) Cas Ve... (fig. 18). — Cortex frontal, insulaire et pallidum présentent tous trois une forte diminution de l'activité du cinquième isozyme. Pour le cortex frontal, il existe une augmentation des trois premiers et pour l'insulaire du premier et du troisième.

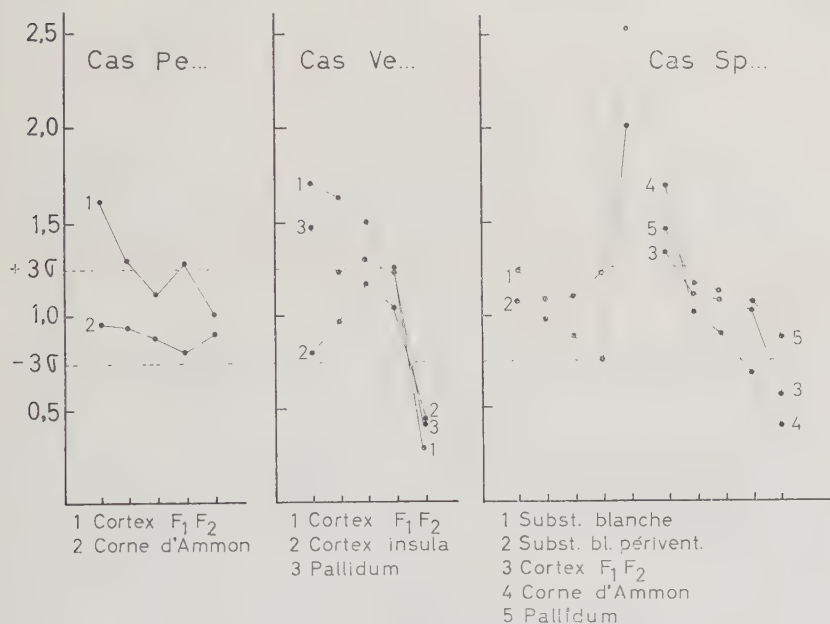


FIG. 18.

c) Cas Sp... (fig. 18). — Pour toutes les structures blanches, on note une très forte hyperactivité du cinquième isozyme. Pour le cortex hémisphérique, une augmentation du premier associée à une baisse du cinquième et pour le pallidum uniquement une hyperactivité du premier.

d) Cas Bl... (fig. 19). — Les parties dorsale et ventrale de la protubérance, l'hippocampe présentent une hyperactivité des quatre premiers isozymes, cette dernière localisation y associant en plus une baisse du cinquième. Pour les structures blanches, par contre, il y a baisse des activités des quatre derniers pour le pédoncule cérébelleux moyen, des quatre premiers pour la substance blanche périventriculaire et uniquement du cinquième pour le centre ovale.

Au contraire, la substance blanche du cervelet présente les troisième, et quatrième isozymes hyperactifs. Le cortex cérébelleux, une baisse du cinquième isozyme. Enfin, excepté pour le quatrième, diminution de l'activité isozymique au niveau du putamen.

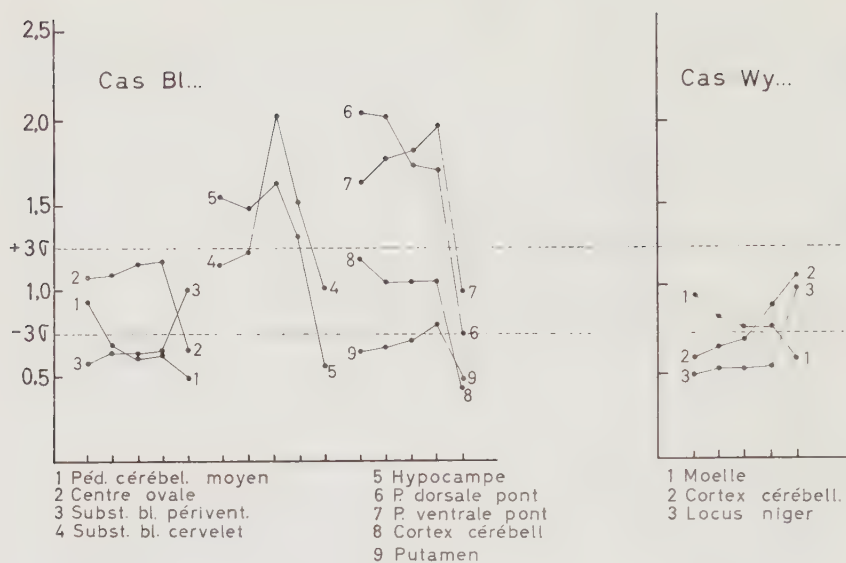


FIG. 19.

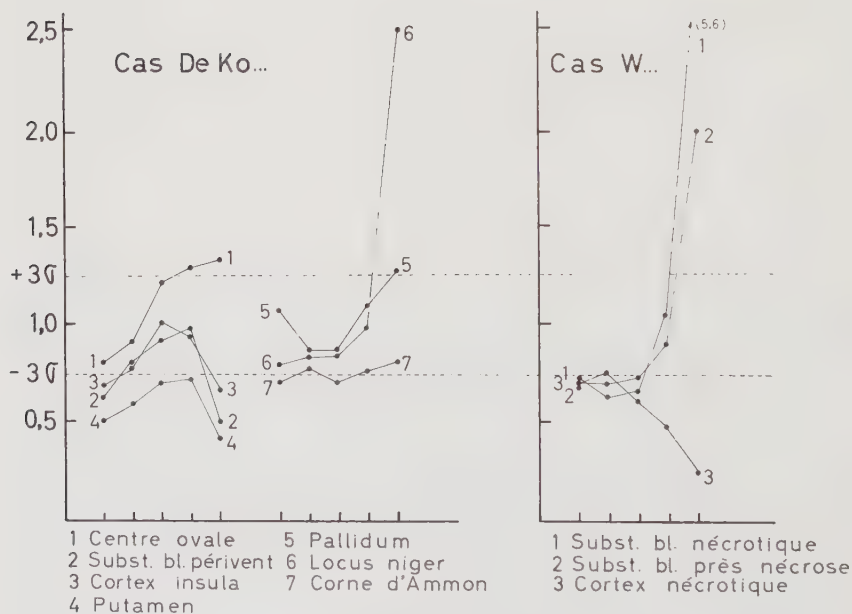


FIG. 20.

e) Cas Wuy... (fig. 19). — Si, assez paradoxalement, on note une hypoactivité du cinquième isozyme dans la moelle, l'activité sera abaissée au niveau des trois premiers dans le cortex cérébelleux et à un degré bien plus important des quatre premiers du locus niger.

f) Cas Dek... (fig. 20). — L'activité isozymique du pallidum est rigoureusement normale. Celle du putamen régulièrement abaissée. Au contraire, on constate une hypoactivité du premier isozyme dans la substance blanche périventriculaire, le cortex insulaire et la corne d'Ammon à laquelle s'associe une hypoactivité du troisième pour cette dernière et du cinquième pour les deux autres. Enfin, on note dans le centre ovale une hyperactivité au niveau des quatrième et cinquième, hyperactivité qui devient très forte pour le cinquième du locus niger.

g) Cas W... (fig. 20). — Nécrose hémorragique de la substance blanche et du cortex adjacent au cours d'une intervention stéréotaxique.

Dans ce dernier cas, pour la substance blanche très forte hyperactivité du cinquième isozyme associée à une baisse des trois premiers et pour le cortex, baisse, excepté pour le second, de l'activité isozymique plus marquée pour le cinquième.

2. Conséquences de ces faits.

Dans les structures blanches (tabl. XL), « l'état congestif » se traduit essentiellement par une hyperactivité du cinquième isozyme, parfois du quatrième, associé à l'extrême à une hypoactivité des trois premiers en cas de nécrose hémorragique du centre ovale. A un foyer du même type situé dans le tronc cérébral répond une hyperactivité des quatre premiers. Pour « l'œdème », une hypoactivité isozymique généralisée est possible avec toutefois une prépondérance nette en fréquence pour le cinquième.

Au niveau du cortex hémisphérique ou cérébelleux, au contraire, il est à remarquer que jamais le cinquième isozyme n'est hyperactif. Son hypoactivité, seule ou associée à l'hyperactivité d'un de deux ou de la totalité des quatre autres, traduit la souffrance du cortex en cas d'œdème cérébral diffus s'accompagnant d'engagement ou non, l'état congestif local ou même de très petits foyers de ramollissement. Associée à l'hypoactivité ou non des quatre autres isozymes, elle extériorisera une souffrance plus localisée : méningite fibreuse ou nécrose hémorragique. L'activité normale du cinquième isozyme peut prouver également l'atteinte corticale par son association, pour la totalité ou non des quatre autres, d'hyperactivité en cas d'hémorragie arachnoïdienne, d'hypoactivité en cas d'intoxication oxycarbonée. Enfin, il est à noter que l'activité basse des trois premiers isozymes du cortex cérébelleux de la maladie de Parkinson semble traduire le processus dégénératif, puisque les isozymes du locus niger ont une disposition du même ordre.

Les isozymes des structures grises profondes ont, en effet, la même sensibilité aux conditions pathologiques. Ainsi — ce qui d'ailleurs montre bien la différence pathogénique avec la maladie de Parkinson — le locus niger du parkinsonisme oxycarboné présentera une forte hyperactivité du cinquième isozyme. Si, dans ce cas, l'activité isozymique du pallidum est normale, elle est régulièrement abaissée dans la zone proche de la lésion : le putamen. Cet abaissement, bien que restreint au dernier isozyme, se retrouve dans le pallidum proche d'un ramollissement capsulaire ancien. Egalement, dans le putamen dans un cas d'œdème cérébral diffus.

Tumeur thalamique

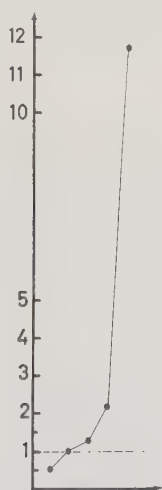


FIG. 21.

Ces grandes variations de chaque isozyme, à notre sens, ne traduisent pas de façon rigide un type lésionnel, mais plutôt témoignent d'une façon plus souple d'un moment dans le devenir du processus pathologique considéré. Reprendre de façon détaillée ces types de résultats parallèlement à une étude neuropathologique très fine semble nécessaire, car cela permettrait de saisir la lésion dans tout son dynamisme.

3. Fait de pathologie animale (fig. 21).

La nécessité d'une telle orientation des recherches futures reçoit une confirmation éclatante dans nos résultats pour une tumeur thalamique découverte fortuitement chez un chat. Il s'agissait d'un spongioblastome. Déjà, la vue de l'enzymogramme extériorisait le boule-

versement des activités isozymiques. Le calcul des rapports ne fait que le confirmer (tabl. XLI).

TABLEAU XLI

	Mobilités	747	559	371	214	109
% activité	Thalamus normal	42,0	21,5	24,1	10,3	2,1
	Tumeur thalamique	17,6	18,3	25,6	18,5	20,0
Surface courbes . .	Thalamus normal	261	138	149	64	13
	Tumeur thalamique	135	140	196	142	153
Rapport d'activité . .		0,51	1,01	1,31	2,21	11,76

Des résultats du même ordre, d'ailleurs, ont été rapportés récemment par différents auteurs, entre autres par Clausen et son équipe.

2. Protéines hydrosolubles.

A. Protéines totales.

Le taux des protéines hydrosolubles varie peu dans les conditions pathologiques. Tout au plus avons-nous pu constater une légère augmentation dans le noyau dentelé et la substance blanche du cervelet d'une maladie de Parkinson (33 et 25 mg/ml), dans le striatum d'un cerveau fortement congestif avec œdème du tronc (cas Sp... 34 mg/ml). Le chiffre le plus fort fut pour un cas de nécrose hémorragique de la substance blanche périventriculaire (57 mg/ml). Au contraire, dans tous les cas d'œdème cérébral, il existait une certaine diminution du taux des protéines (10 à 12 mg/ml) dans le centre ovale et la substance blanche périventriculaire et aussi parfois dans le striatum, les cortex frontal, insulaire et la corne d'Ammon (10 à 12 mg/ml). Enfin, au niveau du locus niger du cas de parkinsonisme oxycarboné, le taux des protéines hydrosolubles était extrêmement bas (7 mg/ml).

B. Fractions protéiques.

1. *Les faits.* Comme pour les activités isozymiques, nous avons considéré le rapport de la concentration de la fraction à la moyenne des concentrations normales de cette même fraction, le tout étant rapporté à 100 mg de protéines hydrosolubles. Dans ces conditions, l'écart type pour la zone normale de ce rapport était de 0,13. Pour les résultats suivants, obtenus à partir des cas déjà utilisés, nous ne mentionnerons donc que les valeurs inférieures à 0,6 et supérieures à 1,4.

a) Cas Wuy... Maladie de Parkinson (fig. 22). — Ce qui frappe dans ce cas est l'atteinte de la zone des préalbumines. Une augmentation de la

seconde et une disparition des troisième et quatrième est même la seule manifestation de la lésion nigrique. Pour le cortex cérébelleux s'y associe une augmentation des α -globulines lentes. Au niveau du noyau dentelé et du pédoncule cérébelleux moyen, apparaissent des variations importantes en plus ou en moins des γ -globulines lentes avec une certaine augmentation de l'albumine et des α -globulines rapides.

b) Cas De Ko... Parkinsonisme oxycarboné (fig. 23). -- Ici aussi, variations des préalbumines. Une disparition des première et troisième avec augmentation de la seconde associée à celle, à un degré moindre, des α -globulines rapides est également la seule extériorisation de l'attente pallidale. Cette augmentation des α -globulines rapides, une diminution des γ -globulines lentes et aucune variation de la zone albuminique semblent d'ailleurs une des caractéristiques de ce type d'intoxication. Il faut insister également sur le taux élevé des α -globulines lentes dans la substance blanche périventriculaire et le centre ovale.

c) Cas W... Nécrose corticale au cours d'une intervention stéréotaxique (fig. 24).

Les phérogrammes des extraits de cortex nécrotique varient très nettement selon le degré de l'atteinte. Dans un premier stade, très forte augmentation de la première préalbumine, augmentation moyenne des α -globulines rapides et de la quatrième γ -globuline. Ensuite, augmentation moindre de la première préalbumine, diminution de la quatrième, des α -globulines rapides, des première et quatrième γ -globulines, mais surtout forte augmentation de l'albumine. Au dernier stade, diminution généralisée du taux des préalbumines.

d) Cas Blo... Récidive d'un glioblastome rétrorolandique. Œdème diffus. Nécrose hémorragique du pont (fig. 25).

Dans la partie dorsale de la protubérance, siège du foyer de nécrose, augmentation de l'albumine, des α -globulines lentes et de la zone des β -globulines. On retrouve également ici une diminution des préalbumines et des α -globulines rapides. La partie ventrale, elle, est caractérisée par une augmentation des première et troisième préalbumines. Enfin, dans le centre ovale et la substance blanche périventriculaire, à une diminution des préalbumines et des α -globulines rapides s'associe une augmentation des α -globulines lentes.

2. *Conséquences* : de ces faits, il semble que pourrait se dégager la notion d'un certain « profil protéique » propre à chaque lésion. Le prouver demanderait une étude complémentaire plus approfondie. Dans ce sens, en effet, un cas de nécrose, un cas d'œdème diffus, une maladie dégénérative et un cas d'intoxication sont loin de couvrir tout le champ de la pathologie nerveuse.

3. **Éléments minéraux.**

Bien que, dans ces types de déterminations, des contaminations accidentelles soient toujours possibles malgré tous le soin que l'on

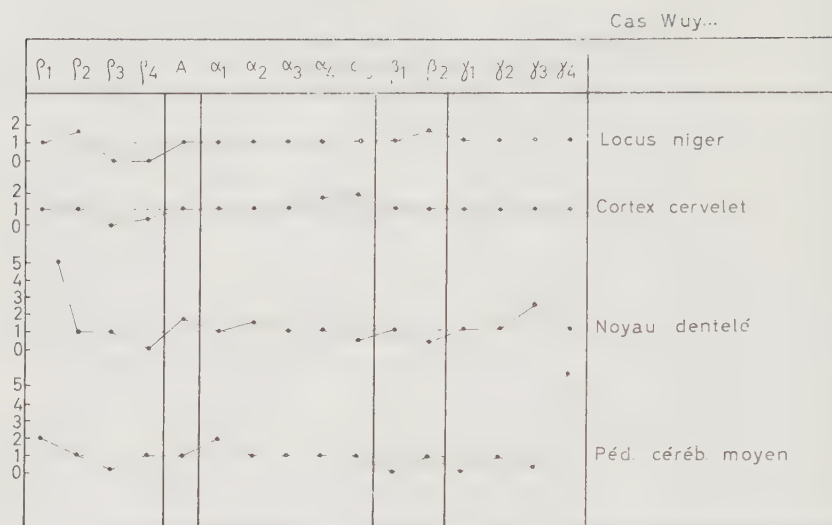


FIG. 22.

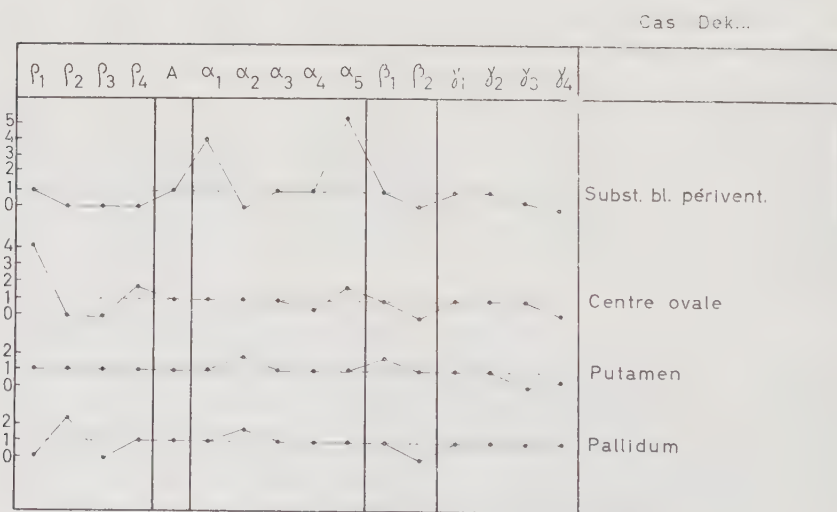


FIG. 23.

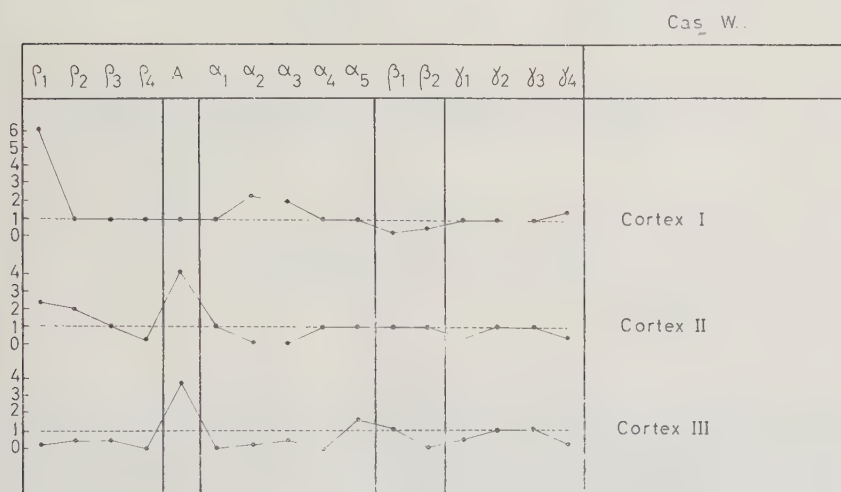


FIG. 25.

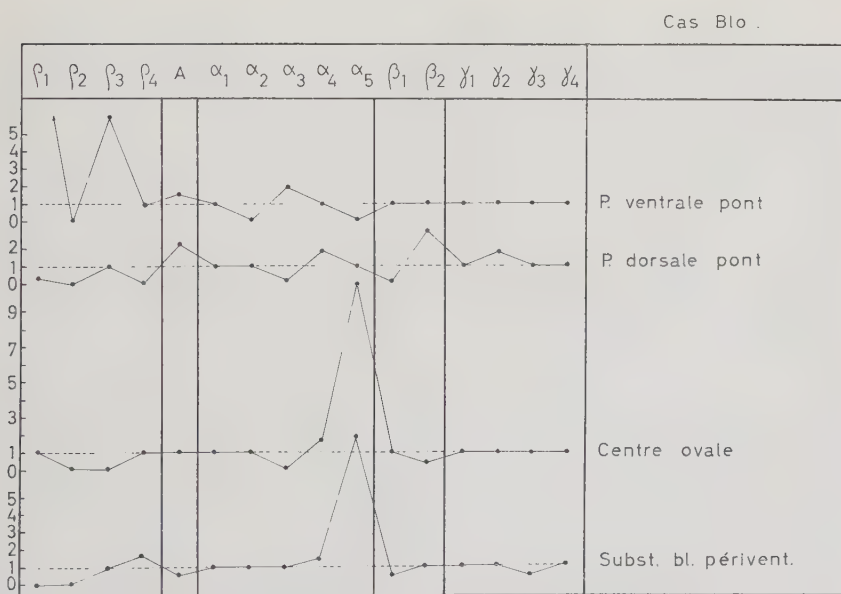


FIG. 24.

apporte à la manipulation, nous donnons dans le tableau XLII les résultats atypiques que nous avons obtenus.

TABLEAU XLII

		TAUX DES ELEMENTS MINERAUX ($\mu\text{g}/100$ mg de matière sèche)			
		Cu	Fe	Mg	Al
Cas VEN...	Moelle	—	—	605,0	—
Cas DEK...	Cortex insulaire	—	—	—	26,1
Cas SPI...	Cortex cérébelleux	12,7	—	—	—
Cas PET...	Cortex F1 F2	—	—	—	34,2
Cas BLO...	Pallidum	—	5,8	—	—

Sauf pour un cas où ils sont nettement bas (pallidum du cas Blo...), tous les chiffres se trouvent plus ou moins augmentés. Sont à noter le taux de l'aluminium cinq à six fois plus fort que la normale dans les cortex insulaire et préfrontal des cas Dek... et Pet... et surtout celui, dix fois plus grands, du magnésium dans la moelle du cas Ven...

III. — Conclusions

Si dans les processus pathologiques — du moins dans ceux considérés ici — la détermination du taux des éléments minéraux apporte des données peu utilisables, il semble toutefois que l'on peut retenir trois grandes notions. Tout d'abord, la vraisemblance d'un certain « profil protéique » pour chaque lésion histologique du système nerveux. Ensuite, selon le degré plus ou moins marqué avec lequel interfère l'anoxie dans cette dernière, l'intérêt de la grande sensibilité du dosage de l'activité lacticodéshydrogénasique totale. Enfin, pour juger de l'évolution lésionnelle, l'importance d'une étude approfondie de l'activité de chaque isozyme considéré séparément.

Parallèlement, il convient de rappeler que dans le système nerveux sain, le taux des éléments minéraux, des protéines hydrosolubles totales, des fractions protéiques et de l'activité lacticodéshydrogénasique totale varient dans des limites précises selon la localisation. L'importance de cette notion de localisation est à souligner, puisque pour chacune il existe également une distribution spécifique des activités isozymiques. Tout en renouvelant que c'est là, une fois encore, la réponse à la première question que nous posions au début de ce travail, cette notion infirme la règle avancée par Wroblewski d'une spécificité tissulaire générale de la distribution isozymique.

CHAPITRE V

Corrélations statistiques

Dans ce chapitre, nous rapporterons les corrélations positives ou négatives existant entre : 1° les activités isozymiques de la lactico-déshydrogénase et les éléments minéraux ; 2° les activités isozymiques elles-mêmes ; 3° les éléments minéraux eux-mêmes dans le tissu nerveux ou les extraits ; 4° les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles totales ou leurs fractions. Ensuite, nous envisagerons les rapports entre ces chiffres significatifs.

I. — Résultats

1. Corrélations entre les activités isozymiques de la LDH et les éléments minéraux.

La même quantité d'extrait étant toujours utilisée pour les enzymo-électrophorèses, ce sont les surfaces des courbes d'absorption des isozymes qui ont servi de base au calcul. Ainsi, deux métaux sont liés statistiquement aux activités isozymiques : le fer et l'argent. Il s'agit de corrélations positives. Elles sont bien marquées pour le cinquième isozyme. De plus, uniquement pour le fer, elles existent également et par ordre décroissant avec le troisième et le quatrième (tabl. XLIII).

TABLEAU XLIII

		I	II	III	IV	V
Fe	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Nb} \\ r \end{array} \right.$			35 0,457	35 0,435	35 0,518
Ag	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Nb} \\ r \end{array} \right.$					18 0,637

2. Corrélations entre les activités des divers isozymes.

En utilisant les surfaces des courbes d'absorption de chaque isozyme dans cent échantillons appareillés, on obtient les résultats consignés

TABLEAU XLIIIbis

II	III	IV	V	
100 1,000	100 0,897	100 0,552		Nb I r
	100 0,942	100 0,722	90 0,230	Nb II r
		100 0,913	90 0,417	Nb III r
			90 0,99	Nb IV r

dans le tableau ci-après. L'examen de ceux-ci permet de constater l'absence de toute union statistique entre le premier et le cinquième isozyme et la presque inexistence de la liaison entre ce dernier et le second.

3. Corrélations des éléments minéraux entre eux.

A. Dans le tissu nerveux.

Neuf éléments ont été comparés entre eux dans leurs valeurs rapportées au gramme de tissu frais. Il s'ensuit douze corrélations positives et cinq négatives (tabl. XLIV). Ces cinq corrélations négatives sont celles du cobalt, du zinc et du manganèse avec le cuivre et le fer. Après ce qui a été rapporté plus haut (cf. chapitre « Résultats »), il n'est pas étonnant que ces trois éléments soient liés entre eux par un chiffre significatif positif égal à l'unité. Si l'on considère le reste des résultats, il ressort que trois éléments sont également essentiels par le nombre et la force de leurs liaisons : le cuivre, le magnésium et le phosphore.

B. Dans les extraits.

Puisque jamais dans ces derniers, le cobalt, le zinc et le manganèse n'ont été détectables, ce sont uniquement six éléments minéraux qui ont été comparés dans leurs valeurs rapportées au millilitre d'extrait. Dans ce chapitre, c'est l'unique fois où le chiffre de référence n'a pas été le gramme de tissu frais. Etant donné le mode d'extraction, il serait d'ailleurs facile de ramener ces taux à ce dernier. Sur les quinze déterminations pratiquées apparaissent deux corrélations posi-

TABLEAU XLIV

Fe	Ag	Mg	Co	Zn	Mn	Al	P	
	25 0,472	42 0,376	23 -0,551	21 -0,610	17 -0,561	33 0,375		Nb Cu r
			23 -0,474	21 -0,513				Nb Fe r
								Nb Ag r
					17 0,500	33 0,372	31 0,433	Nb Mg r
				21 1,000	17 1,000		15 0,651	Nb Co r
					15 1,000		13 0,624	Nb Zn r
							9 0,953	Nb Mn r
								Nb Al r

TABLEAU XLV

Cu	Fe	Ag	Mg	Al	P	
				12 0,750		Nb Cu r
						Nb Fe r
						Nb Ag r
					12 0,774	Nb Mg r
						Nb Al r
						Nb P r

TABLEAU XLVI

[illegible]

TABLEAU XLVII

[illegible]

tives significatives existant déjà dans le tissu : cuivre-aluminium et magnésium-phosphore (tabl. XLV).

4. **Corrélations entre les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles.**

A. Protéines hydrosolubles totales.

Uniquement pour le cuivre existe une corrélation positive significative avec les taux de protéines hydrosolubles rapportés au gramme de tissu frais. Pour trente-trois échantillons appareillés, celle-ci est égale à 0,518.

B. Fractions protéiques solubles.

Cent quatre-vingt dix-huit déterminations, quatorze corrélations positives et deux négatives, tel est le bilan de la recherche des coefficients de Bravais-Pearson liant les éléments minéraux aux fractions protéiques. En fait, le nombre de quatorze corrélations positives doit être ramené à dix puisque quatre fois nous avons obtenus des résultats significatifs pour la première préalbumine et la troisième γ -globuline et pour l'une de leurs sous-fractions (tabl. XLVI et XLVII). De plus, sur les neuf éléments minéraux examinés, le fer, le manganèse et le phosphore n'ont jamais présenté de liaisons statistiques.

II. — Rapports

L'étude des rapports existant entre les diverses corrélations significatives permet, en fait, une appréciation précise de la force, en quelque sorte intrinsèque, unissant chacune des variables examinées deux par deux. En utilisant pour chaque résultat la « variable normale réduite » dont nous avons exposé au chapitre « Techniques » le mode d'établissement, nous allons maintenant reprendre chaque paragraphe du précédent sous-chapitre.

1. **Corrélations entre les activités isozymiques et les éléments minéraux.**

Nous avons vu que deux métaux, le fer et l'argent, sont liés statistiquement aux trois dernières activités isozymiques. Si les unions respectives du fer avec les troisième, quatrième et cinquième isozymes pouvaient être appréciées les unes par rapport aux autres, le nombre différent d'échantillons pour l'établissement de la corrélation significative argent-cinquième isozyme ne permettait pas d'intégrer le résultat dans l'ensemble. Le calcul des variables normales réduites apporte ici la solution (tabl. XLVIII).

TABLEAU XLVIII

Corrélations		N	S	r	Z	z	p
Fe	III	35	+	0,457	0,49	2,76	0,0030
Fe	IV	35	+	0,435	0,47	2,65	0,0040
Fe	V	35	+	0,518	0,57	3,22	< 0,0015
Ag	V	18	+	0,637	0,75	2,90	0,0020

Signification des abréviations utilisées : N = nombre d'échantillons; S = sens de la corrélation; r = coefficient de corrélation; Z = variable normale de Fischer; z = variable normale réduite p = moitié de la probabilité d'apparition.

2. Corrélations entre les activités des divers isozymes.

Certes, le nombre plus important des échantillons rendant presque négligeable la différence de quatre unités pour le cinquième isozyme permettrait une comparaison grossière des différents coefficients de corrélation. Le tableau suivant extériorise pourtant deux points dignes d'intérêt. Evidemment, les grandes différences existant entre les diverses variables réduites, mais surtout, pour presque toutes, le taux extrêmement bas de leur probabilité d'apparition (tabl. XLIX).

TABLEAU XLIX

Corrélations		N	S	r	Z	z	p
I	II	100	+	1,000			0,0000
I	III	100	+	0,897	1,46	14,45	< 0,0015
I	IV	100	+	0,582	0,67	6,63	< 0,0015
II	III	100	+	0,982	2,34	23,16	< 0,0015
II	IV	100	+	0,722	0,91	9,00	< 0,0015
II	V	96	+	0,236	0,24	2,33	0,0100
III	IV	100	+	0,913	1,54	15,24	< 0,0015
III	V	96	+	0,417	0,44	4,27	< 0,0015
IV	V	96	+	0,699	0,87	8,44	< 0,0015

De plus, si on supprime très artificiellement toutes les variables normales réduites inférieures à 8,0 apparaissent deux autres notions importantes. Tout d'abord, les activités des trois premiers isozymes sont très étroitement unies entre elles. Ensuite, l'activité du quatrième isozyme présente une particularité du même ordre pour celle du troisième si elle est liée de façon plus lâche, mais toutefois sensiblement égale, avec celles du second et du cinquième.

3. Corrélations entre les divers éléments minéraux.

Si l'on considère le tableau suivant où sont rassemblés tous les résultats pour le tissu nerveux et ses extraits, l'on constate que les deux corrélations communes aux extraits et au tissu — cuivre-alu-

TABLEAU L

	Corrélations		N	S	r	Z	z	P
Extraits	Cu	Al	12	+	0,680	0,83	2,49	0,0065
	Mg	P	12	+	0,774	1,02	3,09	0,0015
Tissu	Cu	Ag	25	+	0,472	0,51	2,39	0,0085
	Cu	Mg	42	+	0,376	0,39	2,43	0,0075
	Cu	Co	23	-	0,551	0,62	2,78	0,0025
	Cu	Zn	21	-	0,610	0,71	3,02	0,0015
	Cu	Mn	17	-	0,561	0,63	2,35	0,0095
	Cu	Al	33	+	0,375	0,39	2,14	0,0160
	Fe	Co	23	-	0,474	0,51	2,28	0,0115
	Fe	Zn	21	-	0,513	0,57	2,42	0,0080
	Mg	Mn	17	+	0,500	0,55	2,06	0,0195
	Mg	Al	33	+	0,372	0,39	2,14	0,0160
	Mg	P	31	+	0,433	0,47	2,50	0,0060
	Co	Zn	21	+	1,000			0,0000
	Co	Mn	17	+	1,000			0,0000
	Co	P	15	+	0,651	0,78	2,70	0,0035
	Zn	Mn	15	+	1,000			0,0000
	Zn	P	13	+	0,624	0,74	2,34	0,0095
	Mn	P	9	+	0,953	1,86	4,55	<0,0015

TABLEAU LI

	Corrélations		N	S	r	Z	z	P
Protéines totales	Cu	Prot. tot.	33	+	0,518	0,57	3,13	<0,0015
Fractions protéiques	Cu	1277	24	+	0,670	0,81	3,71	<0,0015
	Cu	1332/1277	28	+	0,652	0,78	3,90	<0,0015
	Cu	1069	20	+	0,528	0,59	2,43	0,0075
	Cu	846	27	+	0,454	0,49	2,41	0,0080
	Cu	445	29	+	0,504	0,55	2,80	0,0025
	Ag	1277	9	+	0,812	1,13	2,76	0,0030
	Ag	1332/1277	12	+	0,619	0,72	2,16	0,0155
	Mg	114	32	-	0,361	0,38	2,05	0,0200
	Co	1003	15	+	0,528	0,59	2,04	0,0205
	Co	914	13	+	0,618	0,72	2,27	0,0115
	Co	114	13	+	0,693	0,85	2,68	0,0035
	Co	114/72	13	+	0,625	0,73	2,31	0,0105
	Zn	1003	15	+	0,539	0,60	2,08	0,0190
	Zn	114	13	+	0,718	0,90	2,84	0,0020
	Zn	114/72	13	+	0,646	0,77	2,43	0,0075
	Al	23/-15	26	-	0,447	0,48	2,30	0,0105

minium et magnésium-phosphore — sont bien plus évidentes dans les extraits (tabl. L).

Il est manifeste également qu'un groupe formé de trois métaux : le cobalt, le zinc, le manganèse, assez fortement lié au phosphore, et par son intermédiaire au magnésium, varie statistiquement dans le sens inverse du fer et du cuivre. Ultérieurement, nous reviendrons sur les données essentielles de ces trois derniers paragraphes.

4. Corrélations entre les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles.

Nécessairement plus évocateur que la liste des corrélations significatives entre les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles, le tableau suivant révèle tout d'abord que le cuivre est lié de façon très étroite avec les protéines hydrosolubles totales et dans celles-ci avec la première préalbumine.

TABLEAU LIbis

	1277	1069	1003	914	846	445	114	23/-15
Cu	3,71	2,43			2,41	2,80		
Ag	2,76							
Mg							2,05	
Co			2,04	2,27			2,68	
Zn			2,08				2,84	
Al								2,30

Par ailleurs, si l'on supprime toutes les variables normales réduites inférieures à 2,30, on extériorise le fait que les métaux liés statistiquement correspondent chacun à des fractions protéiques différentes. Pour le cuivre, et accessoirement l'argent, deux préalbumines, une α -globuline et une β -globuline. Pour le cobalt et le zinc, une α et une γ -globuline. Pour l'aluminium, enfin, une γ -globuline (tabl. LI bis).

III. — Conclusions

Excepté pour celles répondant aux corrélations des éléments minéraux dans les extraits cérébraux, nous avons rassemblé toutes les variables normales réduites dans un dernier tableau (tabl. LII). Celui-ci permet de rappeler les points essentiels mis en évidence dans ce chapitre :

1. L'union statistique de certains métaux avec des fractions protéiques qui leur sont propres. A cet égard, la liaison entre le cuivre et la première préalbumine est très nette.

2. Un groupe de trois métaux (cobalt, zinc, manganèse), fortement lié au phosphore et au magnésium, varie en sens inverse du cuivre et du fer.

3. Ce dernier métal présente une corrélation positive pour les trois dernières activités isozymiques, l'argent uniquement pour la cinquième.

4. Les activités isozymiques sont liées entre elles fortement et selon un schéma d'ensemble très particulier (fig. 26).

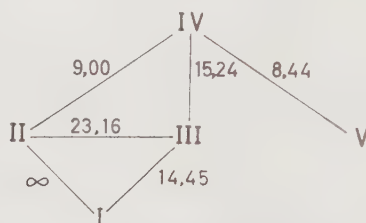


FIG. 26. — Les variables normales réduites inférieures à 8,0 ont été supprimées dans ce schéma.

CHAPITRE VI

Discussion

Dans le système nerveux, à l'opposé de ce qui se passe pour tous les autres organes, les activités isozymiques de la lactico-déshydrogénase varient selon la localisation. Pour tenter d'expliquer cette particularité, il convient de considérer ce que sont ces isozymes, comment ils agissent et surtout pourquoi ils existent.

I. — Structures et cinétiques

Il est maintenant bien établi que tous les isozymes de la LDH ont un même poids moléculaire. De l'ordre de 135.000, il égale celui de l'enzyme « total » obtenu par la technique de Straub. S'ils possèdent un même facteur de frottement de 1,2, ils diffèrent évidemment par leur mobilité et également leur point isoélectrique, ainsi qu'en font foi de façon plus précise les chiffres fournis par Appela et Markert.

Mobilité	I	II	III	IV	V
Mobilité ($\cdot 10^5 \cdot \text{cm}^2/\text{volt}/\text{sec}^*$)	-4,90	-4,00	-2,10	-1,32	+0,63
Point isoélectrique	4,5	4,8	6,8	8,0	9,4

* Tampon phosphate - pH 7,02 - $\mu=0,07$.

Sans conteste, ces derniers auteurs ont apporté une notion capitale pour la connaissance de la structure de l'isozyme lorsqu'ils ont publié en 1961 leurs résultats. Par action d'une solution d'urée 12 M sur l'enzyme cristallisé, ils obtiennent quatre sous-unités, de poids moléculaire identique — sensiblement le quart de celui de la molécule entière — et presque identique au point de vue acides aminés N et C terminaux et composition peptidique après action de la trypsine. Ne présentant aucune activité enzymatique, ces quatre sous-unités migrent à l'électrophorèse en deux bandes distinctes, ce qui sous-entend des différences de charges. Appelant ces deux variétés de

polypeptique A et B, et raisonnant par analogie avec la structure de l'hémoglobine dont la fraction globine est formée de deux chaînes α et de deux chaînes β , Markert et Appela émettent l'hypothèse que les cinq isozymes sont composés chacun de quatre chaînes peptidiques de la façon suivante : A_0B_4 , A_1B_3 , A_2B_2 , A_3B_1 , A_4B_0 . Récemment, en soumettant à l'électrophorèse un mélange de polypeptides A et B, ils ont obtenu cinq composés ayant les mobilités respectives des cinq isozymes. C'est là un argument en faveur du bien-fondé de leur hypothèse qui, en fait, ne sera définitivement prouvée que lorsque l'on connaîtra l'enchaînement des acides aminés de chaque polypeptide et surtout le type et le nombre des acides aminés N terminaux de chaque isozyme. En effet, pour l'instant, uniquement les formules brutes en acides aminés ont été établies.

Quoi qu'il en soit, le fait que les sous-unités obtenues par action d'une solution d'urée 12 M soient inactives au point de vue enzymatique permet d'envisager que le site actif de l'isozyme se trouve à la fois sur deux chaînes peptidiques. Que ce point se vérifie ou non, il semble évident qu'il existe des différences dans le nombre ou les structures des sites actifs des isozymes lorsque l'on considère l'ensemble des résultats cinétiques. Les ayant exposés en détail dans le chapitre d'introduction, nous ne ferons qu'en rappeler ici l'essentiel. En tout premier lieu, leur thermosensibilité propre qui a permis de dire à Plageman — du moins pour les extraits tissulaires de certaines espèces (homme, lapin) — que les logarithmes des constantes de vitesse d'inactivation sont inversement proportionnels aux mobilités électrophorétiques. Les concentrations optimums en pyruvate qui sont de 0,0025 M à pH 7,0 pour le cinquième isozyme et de 0,0006 M à pH 8,0 pour le premier. La grande sensibilité du troisième isozyme (les deux premiers n'étant pas explorés) aux variations de pH lorsqu'il est soumis à l'action inhibitrice du métabisulfite comme l'a noté Bonavita. A un pH uniforme, l'inhibition moins importante du troisième isozyme par rapport aux deux derniers qu'entraîne ce métabisulfite. Cette différence générale entre les trois premiers isozymes et les deux derniers se retrouve dans les constantes de Michaelis établies pour le lactate et le pyruvate, dans l'étude des activités isozymiques avec les analogues du NAD, dans l'action de l'anticorps anti-cinquième isozyme qui inhibe à un taux identique le quatrième et à des taux différents les trois premiers, dans l'action de l'anticorps antipremier isozyme qui inhibe de la même façon les quatrième et cinquième (tabl. LIII). Elle se manifeste également dans l'étude entreprise par Allen avec des substrats différents, en l'espèce sept acides α -hydroxylés (tabl. LIV). Si l'on considère, en effet, les

TABLEAU LIII

	I	II	III	IV	V	
Concentration optimum en pyruvate	0,0006 M (1)	-	-	-	0,0025 (2)	PLAGEMANN (1960)
pH optimum	7,9 à 8,3 6,0 à 8,0	7,9 à 8,3 6,0 à 8,0	7,9 à 8,3 6,0 à 8,0	7,9 à 8,3 6,0 à 8,0	7,9 à 8,3 6,0 à 8,0	VESELL (1961) PLAGEMANN (1960)
Constante de Michaelis ($\cdot 10^{-5} \text{M/l}$)						
. pyruvate	6,7	-	-	-	35,0	PLAGEMANN (1960)
. lactate	1,0 à 2,0	1,0 à 2,0	1,0 à 2,0	5,6	4,2	VESELL (1961)
DéaminoNAD/3 AcetylpyridineNAD	14	14	-	-	3	VESELL (1961)
Inhibition métabisulfite (%)	-	-	40	58,8	70	BONAVITA (1962)
Inhibition anticorps (%)						
. anti - V	6	30	48	70	70	PLAGEMANN (1960)
. anti - I	68	42	21	8	8	PLAGEMANN (1960)
(1) pH 8,0 (2) pH 7,0						

TABLEAU LIV

1	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	ac. lactique
2	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	ac. α hydroxybutyrique
3	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	ac. α hydroxyisobutyrique
4	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	ac. α hydroxyvalérique
5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array}$	ac. α hydroxyisovalérique
6	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	ac. α hydroxycaproïque
7	 $- \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	ac. β phényllactique

deux premiers et les deux derniers isozymes, on constate qu'ils ont une activité légèrement moindre avec l'acide α -hydroxybutyrique qui ne diffère que par un méthyle de l'acide lactique. Au contraire, la structure « iso » dans l'acide α -hydroxyisobutyrique entraîne une perte complète d'activité. Avec les quatre derniers acides, ce sont uniquement les deux derniers isozymes qui présentent à des degrés divers une certaine activité. Celle-ci est surtout marquée avec l'acide hydroxyvalérique, la structure « iso », l'allongement de la chaîne ou la présence d'un radical phényle entraînant une nette diminution.

En fait, tous ces résultats cinétiques ne font que permettre de supposer des différences dans les sites actifs car, à l'heure actuelle, les connaissances analytiques sur ce sujet sont extrêmement restreintes. En premier lieu, à la suite de leurs travaux avec les analogues du NAD, Van Eys, San Pietro et Kaplan estiment qu'il faut deux moles de NAD pour qu'une mole d'acide lactique ou d'acide pyruvique soient transformées. Or, depuis Theorell, on sait que le NAD est uni à un groupement thiol de l'apoenzyme par le carbone 6 de la nicotylamide. Ceci sous-entend qu'au moins deux acides aminés soufrés sont dans le site actif si les conclusions de Van Eys, San Pietro et Kaplan s'avèrent exactes. De leur côté, Winer, Schwert et Millar, suivant fluorimétriquement la formation du complexe enzyme total-NADH², constatent que trois à quatre moles de NADH² se fixent sur une mole d'enzyme. Il est possible que ce chiffre soit la moyenne des fixations de NADH² sur les divers isozymes. Quoi qu'il en soit, Pfleiderer trouve au niveau du myocarde du porc, du rat et du muscle du rat quatorze groupements thiols par molécule dans les cinq iso-

zymes. Or, toujours selon cet auteur, la lacticodéshydrogénase totale du myocarde de porc n'a que trois groupements thiols actifs enzymatiquement, la totalité ne devenant réactive qu'après dénaturation par l'urée. Pour cette LDH totale, après l'action inhibitrice du p. mercuribenzoate (abolie d'ailleurs par le glutathion), deux thiols demeurent réactifs. Ces deux thiols sont suffisants pour une activité enzymatique. A côté des acides aminés soufrés, il semble que l'on peut ranger dans les acides aminés dont la présence est vraisemblable dans les sites actifs l'histidine et un ou plusieurs acides aminés aromatiques. Pour ces derniers, Shifrin et Kaplan à la suite de leurs expérimentations estiment qu'ils sont très proches du site actif. Pour le premier, Terayama et Vestling ont apporté la preuve que le noyau imidazol pouvait réagir avec la pyridine. D'ailleurs, l'un des deux autres acides aminés basiques pourrait jouer un certain rôle du moins dans le premier isozyme. La trypsine, en effet, coupe les chaînes peptidiques au niveau des carboxyles de la lysine ou de l'arginine. Or, agissant à la concentration de 0,15 mg par millilitre de tampon barbital pH 8,6 sur le premier isozyme purifié du myocarde de lapin, elle entraîne selon Plagemann une augmentation du rapport V1/V2, V1 et V2 représentant respectivement les vitesses de réaction pour des concentrations en pyruvate de 0,0012 M et 0,00015 M.

Jours	Contrôles	+ Trypsine	+ Peptidase*
0	0,34	0,43	0,33
1	0,39	0,62	0,38
2	0,57	1,30	0,38
3	0,61	—	—
20	0,93	—	—

* Même concentration que la trypsine.

Enfin, nous signalerons l'hypothèse du site actif double d'Ottolenghi et Denstedt. Il y aurait un site pour la transformation du lactate en pyruvate et un autre pour celle du pyruvate en lactate. La combinaison du pyruvate avec celui réservé au lactate expliquerait l'inhibition par excès de pyruvate. Par contre, pour Novoa, Winer, Glaid et Schwert il n'y aurait qu'un seul site agissant dans un sens ou dans l'autre selon l'état réduit ou oxydé du NAD.

II. — Raisons d'existence

Etablissement d'une hypothèse de travail

On en arrive ainsi à la constatation que les cinq isozymes de la lacticodéshydrogénase, différents par leurs propriétés cinétiques, pré-

sident chacun à une réaction biochimique exactement du même type : la transformation du lactate en pyruvate et réciproquement. A cela, une raison existe mais inexploitée pour l'instant. N'engageant que nous-mêmes, nous allons maintenant exposer une hypothèse de travail donnant une solution de ce problème, hypothèse qu'ultérieurement — si nous en avons les possibilités — nous tenterons de vérifier. Nous soulignons que ce ne sera là qu'une hypothèse de travail et qu'elle doit être considérée comme telle. Il se peut, en effet, qu'elle soit fautive. L'idée directrice est de replacer la réaction enzymatique au niveau du véritable carrefour métabolique que représente l'acide pyruvique et de l'articuler avec les trois grandes voies qui aboutissent à ce dernier : la glycolyse et par l'intermédiaire de l'acétyl CoA, le cycle de Krebs et la chaîne de synthèse des lipides. Pour étayer cette façon de faire, il existe des données analytiques, statistiques, biochimiques et pathologiques.

1. Données analytiques.

En 1962, Bonavita a repris au point de vue ontogénétique une idée exprimée l'année précédente par Pfeleiderer et Wachsmuth et appliquée par Cahn à la théorie de Markert et Appela. Seraient très actifs les isozymes les plus lents, surtout le cinquième, dans les tissus à métabolisme anaérobie et dans des conditions aérobies strictes les plus rapides, surtout le premier. Autrement dit, le polypeptide A de Markert serait lié à l'anaérobiose et le polypeptide B à l'aérobiose. Ainsi, chez le rat nouveau-né dont on connaît la grande résistance à l'anoxie, il existe une hyperactivité des derniers isozymes de la LDH du système nerveux. Après le cinquantième jour, cette hyperactivité est située au niveau des premiers. Ce phénomène a été retrouvé par d'autres auteurs. Markert évoque même pour l'expliquer une perte d'activité du gène présidant la biosynthèse du polypeptide A au profit de celui gouvernant celle du polypeptide B.

Quoi qu'il en soit, en 1955, McIlwain a rapporté les taux extrêmes des principaux termes de la glycolyse dans le système nerveux (tabl. LV). Exprimés en concentrations moléculaires (tabl. LVI), ces taux montrent des différences frappantes, même si l'on ne se contente d'examiner que leurs moyennes. Certes, une quantité importante de lactate et de corps possédant des liaisons phosphate riches en énergie, mais surtout une disproportion évidente de ces termes avant et après le fructose 1-6 diphosphate : forte d'abord, très restreinte ensuite. Reprenant les travaux d'Aisenberg et Van Potter, récemment, Balazs et Richter ont donné une explication dynamique pour ces résultats. La glycolyse ne présente un rendement maximum qu'en

TABLEAU LV

	CONCENTRATIONS ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais)	
	Minimum	Maximum
Glycogène (hexoses)	870	1280
Glucose	580	1020
Glucose 1 phosphate	26	260
Glucose 6 phosphate	26	520
Fructose 6 phosphate	26	78
Fructose 1-6 diphosphate	10	27
3 phosphoglycéraldéhyde	—	25,5
Phosphodihydroxyacétone	—	25,5
Ac. 3 phosphoglycérique	9,5	46,5
Ac. 2 phosphoglycérique	9,5	46,5
Ac. phosphoénolpyruvique	—	130
Ac. pyruvique	8,8	17,6
Ac. lactique	130	230
ATP	1060	1540
Phosphocréatine	610	800
NAD	99	180
Thiamine	0,8	1,5

TABLEAU LVI

	Poids moléculaire	CONCENTRATIONS MOLECUL. ($\cdot 10^{-9}$)/g tissu frais		
		Minimum	Maximum	Moyenne
Glycogène (hexoses)	180	4830	7110	5970
Glucose	180	3222	5666	4444
Glucose 1 phosphate	260	100	1000	550
Glucose 6 phosphate	260	100	2000	1050
Fructose 6 phosphate	260	100	300	200
Fructose 1-6 diphosphate	340	29	79	55
3 phosphoglycéraldéhyde	170	—	150	150
Phosphodihydroxyacétone	170	—	150	150
Ac. 3 phosphoglycérique	186	51	250	150
Ac. 2 phosphoglycérique	186	51	250	150
Ac. phosphoénolpyruvique	168	—	773	773
Ac. pyruvique	88	100	200	150
Ac. lactique	90	1444	2911	2177
ATP	504	2103	3055	2580
Phosphocréatine	211	2891	3791	3340
NAD	743	133	242	187
Thiamine	234	3,4	6,4	4,9

anaérobie. Dans les conditions d'aérobiose propres au système nerveux, il existe, du fait de ces dernières, une inhibition à des degrés divers de trois enzymes de cette glycolyse : hexokinase, phosphofructokinase et triose phosphate déshydrogénase. Ces trois enzymes président à des phosphorylations : du glucose en glucose 6-phosphate, du fructose 1-phosphate en fructose 1-6 diphosphate, du 3-phosphoglycéraldéhyde en acide 1-3-diphosphoglycérique. Selon ces auteurs

et aussi selon Racker et Wu, Chance, Lynen et Koenigsberger, cette inhibition serait due pour une part au fait qu'en aérobiose l'ATP lié des mitochondries le serait dans une forme peu accessible à ces enzymes pour les phosphorylations qu'elles régissent. En tenant compte du rôle de l'aldolase dédoublant le fructose 1-6-diphosphate en deux trioses, on constate à partir de ce dernier métabolite une assez bonne concordance des concentrations moléculaires. Dès lors, il est possible de retrancher les taux moyens de métabolites de la glycolyse. En supposant une inhibition sensiblement identique pour les trois enzymes — ce qui serait en accord avec les résultats expérimentaux de Balazs et Richter — on obtient les concentrations moyennes exprimées dans la colonne de droite du tableau LVII.

TABLEAU LVII

	CONCENTRATIONS MOLECUL. MOYENNES ($\cdot 10^{-9}$)/g tissu frais	
	Chiffres totaux	Après déduction de la glycolyse
Glucose 1 phosphate	550	495
Glucose 6 phosphate	1050	995
Fructose 6 phosphate	200	145
Fructose 1-6 diphosphate	55	—
3 phosphoglycéraldehyde	150	—
Phosphodihydroxyacétone	150	150
Ac. 3 phosphoglycérique	150	—
Ac. 2 phosphoglycérique	150	—
Ac. phosphoénolpyruvique	773	623
Ac. pyruvique	150	—
Ac. lactique	2177	2027

Etant donnés les travaux de Balazs et de Richter rapportés plus haut, étant donné également le fait que dans les enzymogrammes des diverses localisations du système nerveux humain adulte, on note une nette hypoactivité des quatrième et cinquième isozymes, il semble que l'on peut rattacher la glycolyse classique à ces deux derniers isozymes. En effet, à l'aide de métabolites marqués, Shaw et Statie ont montré en 1959 qu'il existait deux types de glycolyse. L'une en présence d'insuline fabriquerait du glycogène. L'autre serait insensible à celle-ci et ne formerait de ce fait ni glucose 1-phosphate ni glycogène. Etant donné leurs activités respectives, le cinquième isozyme pourrait être relié au second type et le quatrième au premier type de glycolyse, autrement dit essentiellement au stockage du glycogène.

Si l'on considère la colonne de droite du tableau page 000, on constate les taux élevés du glucose 6-phosphate et de l'acide phosphoénolpyruvique après déduction des taux moyens des métabolites de

la glycolyse. Or, depuis Dickens et Glock, Glock et McLean, on sait que les enzymes du cycle des pentoses sont présents dans le tissu nerveux. Une partie du glucose 6-phosphate — ainsi, d'ailleurs, que le fructose 6-phosphate et le phosphodihydroxyacétone — pourrait donc être métabolisé dans ce dernier.

Que pourraient alors devenir l'acide phosphoénolpyruvique et le glucose 6-phosphate restants ? Comme l'a montré Breckenridge, reprenant pour le système nerveux les travaux généraux de Leloir et son école sur le système « uridine triphosphate » (UTP), ces deux

Tableau selon BRECKENRIDGE et CRAWFORD.

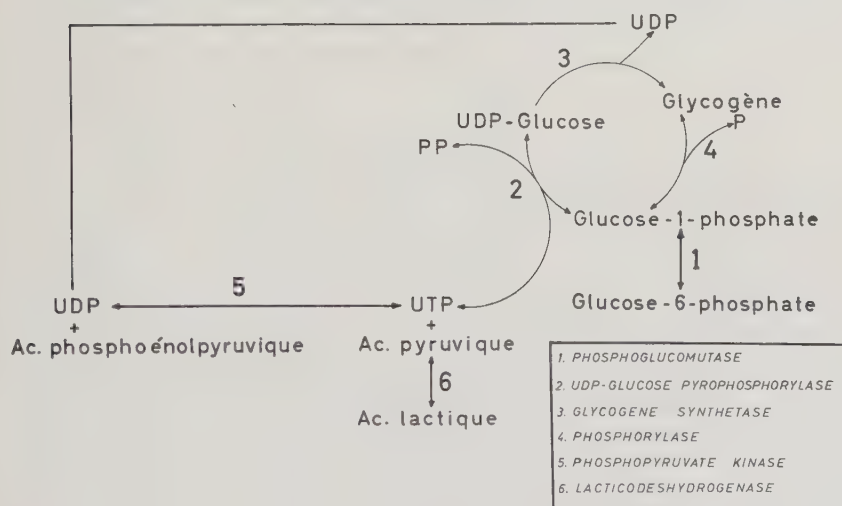


FIG. 27.

métabolites participent aussi à la formation du glycogène. En effet, sous l'action de la phosphopyruvate kinase, l'acide phosphoénolpyruvique se transforme en acide pyruvique en abandonnant sa liaison phosphate riche en énergie à l'uridine diphosphate. De son côté, le glucose-6-phosphate devient glucose-1-phosphate grâce à la phosphoglucomutase. A partir de cet UTP et de ce glucose 1 phosphate on arrive au glycogène grâce à l'UTP-glucose pyrophosphorylase et à la glycogène synthétase (fig. 27).

Après cette intervention du cycle des pentoses et la transformation en glycogène des métabolites résiduels, la seule voie pour le lactate est celle du pyruvate qui, après décarboxylation selon le schéma de

sens inverse de celui du phosphore. Il semble donc possible d'admettre que les activités des trois derniers isozymes sont liées au phosphore, d'autant plus que dans les extraits il existe une forte union de ce dernier avec le magnésium dont on connaît la présence nécessaire pour l'activité des transphosphatases (tabl. LVIII).

L'union des trois derniers isozymes avec le phosphore admise, il convient d'envisager quelles grandes voies métaboliques utilisent préférentiellement cet élément. Evidemment, la glycolyse, les mécanismes de stockage du glycogène, mais aussi les voies de synthèse des lipides impliquant le coenzyme A. Ce n'est pas l'endroit de rappeler tous les corps phosphorés participant aux biosynthèses de ces derniers. Comme nous avons admis précédemment que les deux derniers isozymes étaient liés à la glycolyse et au stockage du glycogène, il s'ensuit que l'on pourrait relier le troisième à la biosynthèse des lipides. Si l'on revient à la première proposition d'hypothèse de travail on aboutit alors à l'équation :

Isozymes I + II = cycle de Krebs + cycle des pentoses.

Statistiquement, l'activité du deuxième isozyme est liée à celle du quatrième. Cette dernière l'est également à celle du cinquième (fig. 26 du chapitre « Corrélations statistiques »). Il semble donc que ceci implique une utilisation de métabolites communs comme nous l'avons vu au paragraphe des données analytiques et le deuxième isozyme pourrait être attribué au cycle des pentoses. De ceci, il découle que le premier isozyme, de son côté, pourrait être rapproché du cycle de Krebs et que sa liaison avec le troisième ne ferait qu'extérioriser leur commune dépendance envers l'acetylCoA.

Une deuxième proposition, plus précise, d'hypothèse de travail peut alors être formulée :

Isozyme I	= cycle de Krebs
Isozyme II	= cycle des pentoses
Isozyme III	= biosynthèse des lipides
Isozyme IV	= stockage du glycogène
Isozyme V	= glycolyse

3. Données biochimiques.

Si Klingenberg, Slenczka et Ritt ont montré que dans les muscles des ailes des insectes le taux de cytochrome C était extrêmement fort, chez les êtres plus évolués c'est le myocarde qui en est le plus fourni. Pour s'en convaincre, il suffit d'examiner le tableau suivant où sont rassemblés les résultats obtenus par Stotz chez le rat.

Concentrations en mg/g de matière sèche	
Localisations	Taux
Cœur	2,34
Rein	1,36
Tissu embryonnaire.	0,18
Tissu tumoral.	0,02

Or, si l'on se réfère aux travaux de Wroblewski, dans le myocarde de l'adulte, c'est toujours les deux premiers isozymes qui présentent l'activité la plus forte. Il y aurait là concordance avec les données statistiques puisque l'on connaît l'union intime du cytochrome C avec les cycles aérobies.

D'autre part, Klingenberg et Bücher, étudiant les sommes des pyridine-nucléotides, $\text{NAD} + \text{NADH}^2$ et $\text{NADP} + \text{NADPH}^2$, par rapport aux fonctions physiologiques, attribuent un rôle à la première dans la production d'énergie et à la seconde dans les processus de synthèse. Autrement dit, $\text{NAD} + \text{NADH}^2$ reflète le cycle de Krebs et $\text{NADP} + \text{NADPH}^2$ le cycle des pentoses et les autres biosynthèses. Ainsi (tabl. LIX), l'énergie nécessaire pour l'intense activité d'un

TABLEAU LIX

	Concentrations en $\mu\text{M/g}$ de protéine	
	$\text{NAD} + \text{NADH}^2$	$\text{NADP} + \text{NADPH}^2$
Muscles des ailes de <i>Locusta Migratoria</i> . .	2,4 à 4,1	0
Myocarde.	4,2 à 5,7	0,8 à 1,0
Foie	1,2 à 2,7	1,9 à 5,7

myocarde ou des muscles des ailes de *Locusta Migratoria* se traduit par les valeurs importantes de $\text{NAD} + \text{NADH}^2$, chez l'insecte $\text{NADP} + \text{NADPH}^2$ étant même totalement absent. Or, Vesell, s'il constate comme Wroblewski que les deux premiers isozymes du myocarde de l'adulte sont plus actifs, trouve que l'activité du premier est toujours plus importante que celle du second. Donc, ici encore concordance : isozyme I, cycle de Krebs et isozyme II, cycle des pentoses.

4. Données pathologiques.

De nombreux auteurs ont déjà signalé la fréquence de l'hyperactivité du quatrième et surtout du cinquième isozyme de la lactico-déshydrogénase dans les extraits de tumeurs malignes. Dans le chapitre « Résultats », nous en avons rapporté un cas pour une tumeur

thalamique du chat (fig. 21). En mai 1963, au XI^e Colloque de Bruges sur les protides des liquides biologiques, Gerhardt et Clausen ont conclu que dans les extraits des tumeurs malignes primitives ou secondaires du système nerveux ou d'autres localisations, l'hyperactivité des quatrième et cinquième isozymes s'associait à une hypoactivité des deux premiers. Cette constatation est importante, car elle rejoint l'ensemble des travaux de Warburg sur le cancer. Par des mesures manométriques cet auteur, en effet, a apporté la démonstration que la formation des cellules cancéreuses correspondait à une destruction progressive et irréversible de la respiration cellulaire et à un accroissement de la glycolyse nécessaire pour équilibrer le bilan énergétique, la cellule utilisant pour cela toutes ses réserves. A 38°C, pendant une heure et pour un milligramme de tissu sec, il mesure les trois coefficients $Q_{O_2}^{(O_2)}$, $Q_{CO_2}^{(O_2)}$, $Q_{CO_2}^{(N_2)}$ correspondant pour les deux premiers à la consommation en oxygène et au dégagement en anhydride carbonique dans un milieu saturé en oxygène et pour le troisième au dégagement en anhydride carbonique dans un milieu strictement anaérobie (tabl. LX). L'anhydride carbonique, dégagé du bicarbonate ajouté au milieu, caractérise la formation des acides, pratiquement celle de l'acide lactique.

TABLEAU LX

	Foie	Rein	Tissu embryonnaire	Cellules cancéreuses
$Q_{O_2}^{(O_2)}$	—15	—15	—15	—7
$Q_{CO_2}^{(N_2)}$	1	1	25	60
$Q_{ATP}^{(O_2)}$	105	105	105	49
$Q_{ATP}^{(N_2)}$	1	1	25	60
$Q_{ATP}^{(O_2)} + Q_{ATP}^{(N_2)}$	106	106	130	109
$Q_{ATP}^{(N_2)} / Q_{ATP}^{(O_2)}$	0,009	0,009	0,238	1,224

Admettant pour la formation de l'acide lactique à partir du glucose la synthèse d'une mole d'ATP et de sept moles d'ATP à la suite de la combustion d'une molécule d'oxygène, il établit facilement deux autres coefficients : $Q_{ATP}^{(N_2)}$ et $Q_{ATP}^{(O_2)}$. Si la somme de $Q_{ATP}^{(O_2)}$ et de

$Q_{ATP}^{(N_2)}$ montre que cellules normales et cancéreuses produisent sensiblement la même quantité totale d'énergie, le rapport $Q_{ATP}^{(N_2)} / Q_{ATP}^{(O_2)}$ extériorise le fait que la cellule cancéreuse est très peu pourvue de l'énergie de respiration indispensable à toute cellule différenciée. Ainsi, on pourrait avancer que le degré de malignité d'une tumeur est en quelque sorte proportionnel à l'hyperactivité des deux derniers isozymes et inversement proportionnel à l'hypoactivité des deux premiers.

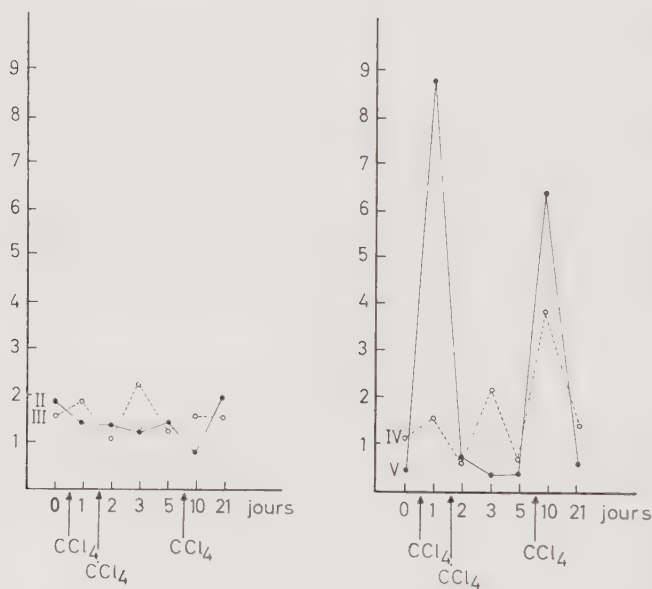


FIG. 28.

A des degrés moindres, cette prépondérance de la glycolyse se retrouverait dans d'autres processus. Plus haut (cf. chapitre « Résultats »), nous avons rapporté un cas de parkinsonisme oxycarboné (cas Dek...) se traduisant entre autre par une augmentation de l'activité du cinquième isozyme au niveau du centre ovale, du pallidum et du locus niger. Au même endroit également, un cas de nécrose de la substance blanche (cas W...) extériorisant une légère hypoactivité des trois premiers isozymes associée à une forte hyperactivité du cinquième. Ce dernier exemple rejoint la notion de l'hyperactivité transitoire du cinquième isozyme sérique bien mis en évidence par Wieme au cours des nécroses aiguës d'origine toxique du parenchyme hépatique.

Une autre affection a fait l'objet de nombreuses publications : l'infarctus du myocarde. Il se traduit très précocement par une hyperactivité du premier isozyme sérique et accessoirement du second. On a voulu voir là la traduction du passage dans le torrent circulatoire d'une partie de la lacticodéshydrogénase de la fibre musculaire lésée. On comprend mal pourquoi uniquement deux isozymes verraient leur activité modifiée. Peut être s'agit-il là plus simplement du passage dans la circulation du cytochrome C dont on sait le myocarde très riche ? Dans le même ordre d'idées, d'ailleurs, on pourrait imaginer pour l'hyperactivité du cinquième isozyme sérique au cours des nécroses aiguës hépatiques, la métabolisation brutale d'une forte quantité de glycogène. En effet, si l'on reprend les résultats de Wieme obtenus au cours de l'intoxication du singe par le tétrachlorure de carbone, on s'aperçoit qu'il existe également une augmentation transitoire de l'activité du quatrième isozyme sérique à côté de l'hyperactivité signalée du cinquième. Pour le mettre clairement en évidence, il suffit, en supposant que l'activité brute du premier isozyme sérique demeure constante au cours de l'expérimentation, de rapporter les pourcentages d'activité des quatre autres isozymes à celui du premier pris comme unité. On voit nettement la coexistence de ces deux hyperactivités, le quatrième augmentant alors que le cinquième diminue avec le temps (fig. 28). Le troisième jour de l'expérience, après la seconde ingestion de tétrachlorure de carbone, il y a même uniquement une hyperactivité du quatrième accompagnée d'ailleurs d'une légère augmentation de l'activité du troisième. Enfin, c'est également une nette hyperactivité du troisième isozyme sérique que signale Vesell au cours des pancréatites aiguës hémorragiques dont on connaît les gros troubles du métabolisme lipidique.

III. — Conséquences de l'hypothèse de travail

1. Problèmes particuliers.

Une expérimentation approfondie pour vérifier cette hypothèse de travail s'imposera, car elle introduisait un principe théorique nouveau. Tous les enzymologistes, certes, ont montré la spécificité de la lacticodéshydrogénase pour son substrat mais, si l'hypothèse s'avère juste, chaque isozyme serait lié lui aussi étroitement à une voie métabolique. Ainsi, il y aurait une spécificité double pouvant se résumer dans la formule : « substrat — isozyme — voie métabolique ». Autrement dit, l'isozyme, en plus de son activité enzymatique, jouerait un véritable rôle d'aiguillage.

A supposer ce premier rôle résolu, le problème demeurerait encore

complexe, car les deuxième, troisième et quatrième isozymes seraient liés à des voies de synthèse. Or, depuis Yudkin, Mandelstam et surtout Monod, on sait que l'activité d'une voie de synthèse est fonction de la concentration moléculaire du produit terminal. A ce niveau, entrerait en jeu des mécanismes de régulation enzymatique, et il faudrait tenir compte des taux de protéines, de lipides et de glycogène formés. Ces mécanismes pourraient être de deux ordres : soit « rétro-inhibition », soit « répression ». Dans le cas de « rétro-inhibition », le produit terminal — protéines, lipides, glycogène — jouerait le rôle d'inhibiteur compétitif envers le premier enzyme de la chaîne, en l'espèce les deuxième, troisième ou quatrième isozymes. Il y aurait là un véritable ajustement au besoin du moment. Adaptation beaucoup plus durable serait le mécanisme de « répression », puisqu'alors le produit terminal inhiberait la synthèse de tous les enzymes intervenant dans la chaîne depuis le produit initial donc également la synthèse des deuxième, troisième et quatrième isozymes.

En dernière analyse — encore une fois, l'hypothèse de travail prouvée — chaque isozyme ne serait que l'enzyme adaptée à une voie métabolique et le dosage de l'activité enzymatique « totale », une appréciation grossière, globale, de l'ensemble des divers types d'activités réelles. Autrement dit, la lacticodéshydrogénase, ce serait l'isozyme et non l'ensemble des isozymes. Il y aurait cinq types de lacticodéshydrogénase. Dès lors, s'expliquerait facilement que Wroblewski ait pu trouver une spécificité selon l'organe de la disposition des activités isozymiques. Sauf le cerveau, pour ainsi dire tous les organes présentent une certaine homogénéité cellulaire et métabolique. Tout aussi facilement comprendrait-on la faillite du principe avancé par cet auteur pour le système nerveux, puisque celui-ci n'est qu'hétérogénéité et ce n'est pas l'endroit d'énumérer toutes les propriétés connues, histologiques, physiologiques et neurochimiques, prouvant cette hétérogénéité métabolique.

2. Généralisation de l'hypothèse.

Le fait que le pyruvate est un véritable pivot métabolique, la première étape de plusieurs chaînes, le fait également que nous n'exposons ici qu'une hypothèse de travail autorisent, croyons-nous, d'envisager le problème sur un plan théorique plus vaste. Déjà, Stadtman, Cohen et Le Bras évoquaient implicitement cette possibilité. *Ainsi, pourraient présenter ce que nous appelons actuellement des isozymes les enzymes présidant à la formation du premier métabolite commun à plusieurs chaînes.* Dans la fig. 29, pour les trois chaînes abM, abO et abN, il y aurait Ea1, Ea2 et Ea3. Comme Ea1, Ea2, Ea3 seraient

trois types de ce qu'actuellement on considère comme Ea, il s'ensuivrait nécessairement qu'il existerait une liaison inconnue, structurale ou d'un autre type, entre par exemple Ea1 et Eb. Dès lors, Ec, Ed, Ee ne présenteraient pas d'isozymes puisqu'ils n'agiraient que le long d'une seule direction métabolique. D'ailleurs, toujours en considérant la chaîne abM, on pourrait imaginer que le métabolite g, à l'origine de plusieurs chaînes secondaires fgP et fgQ, pourrait être formé par l'enzyme Ef sous ses trois formes Ef1, Ef2 et Ef3. Il serait facile de trouver des exemples dans l'abondante littérature actuelle sur les

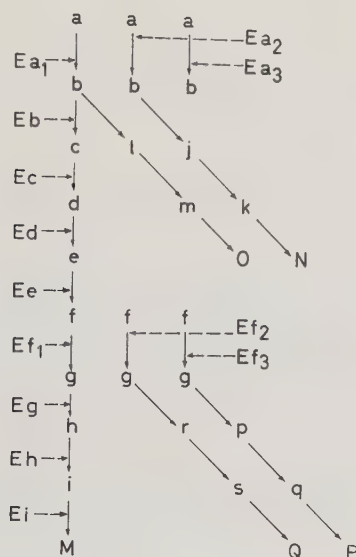


FIG. 29.

isozymes. Quoi qu'il en soit, vus sous cet angle, les isozymes deviendraient un moyen facile d'apprécier l'intensité des divers métabolismes et leurs liaisons réciproques. Mais tout ceci demeure encore à vérifier.

CHAPITRE VII

Conclusions générales

1. Chez l'homme et les animaux, les isozymes de la lactico-déshydrogénase sont bien caractérisés par leurs mobilités et leurs fréquences d'apparition.

2. Dans le système nerveux, la distribution des activités isozymiques est spécifique de la localisation.

3. Des corrélations statistiques significatives existent dans le système nerveux humain adulte pour les activités isozymiques, les éléments minéraux. Elles existent également entre les protéines hydrosolubles et les éléments minéraux, entre ces derniers et les activités isozymiques.

4. La spécificité de distribution liée à la localisation pourrait être expliquée par une hypothèse de travail selon laquelle chaque isozyme dépendrait d'une voie métabolique.

5. Les conséquences de cette hypothèse de travail serait une liaison étroite certes isozyme-substrat mais aussi isozyme-voie métabolique ultérieure. En d'autres termes, il existerait plusieurs types de lactico-déshydrogénase et chacun ferait partie d'une voie métabolique particulière.

6. Une généralisation de l'hypothèse de travail semble possible.

Bibliographie

- ACHER R. Biochemistry of the protein hormones. *Ann. Rev. Bioch. Palo Alto, California*, 29, 547, 1960.
- AISENBERG A.C. et VAN POTTER R. Studies on the Pasteur effect. II. Specific mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 224, 1115, 1957.
- ALLEN J. et SLATER J. A cytochemical analysis of the lactic dehydrogenase-diphosphopyridine nucleotide diaphorase system in the epididymis of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 221, 1961.
- ALLEN J.M. Multiple forms of lactic dehydrogenase in tissues of the mouse, their specificity and responses to altered physiological conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 937, 1961.
- ALLEN S.L. Inherited variations of esterases of Tetrahymena. *Genetics*, 45, 1051, 1960.
- ALLEN S.L. Genetic control of the esterases in the protozoan Tetrahymena pyriformis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 753, 1961.
- AMELUNG D.L. Die Heterogenität von Fermenten in den Organen und im Serum. *Dtsch. Med. Wschr.*, 86, 15, 731, 1961.
- ANDERSON B.M., CIOTTI C.J. et KAPLAN N.O. Chemical properties of 3 substituted pyridine analogues of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 234, 1219, 1959.
- APPELA E. et MARKERT C.L. Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 6, 171, 1961.
- APPELA E. et MARKERT C.L. Physicochemical properties of purified isozymes of lactate dehydrogenase from different sources. *Fed. Proc.*, 21, 253, 1962.
- APPELA E. et MARKERT C.L. Physicochemical structure of lactate dehydrogenase isozymes. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- APPLEBY C.A. et MORTON R.K. Crystalline cytochrome b_2 and lactic dehydrogenase of yeast. *Nature*, 173, 749, 1954.
- ATKINSON M.R., DIXON M. et THORNBURGH J.M. Multiple forms of flavoprotein oxydo-reductases from heart muscle particules. *Biochem. J.*, 83, 2, 29P, 1962.
- AUGUSTINSSON K.B. Multiple forms of esterases in vertebrate blood plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 844, 1961.
- AVRON M. et JAGENDORF A.T. A TPNH diaphorase from chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 475, 1956.
- PACH M.L., SIGNER E.R., LEVINTHAL C. et SIZER I.W. The electrophoretic patterns of alkaline phosphatase from various E. Coli mutants. *Fed. Proc.*, 20, 225, 1961.
- BALAZS R. et RICHTER D. The regulation of glucose metabolism in the brain, in Kety S.S. et Elkes J. *Regional Neurochemistry* (The regional chemistry, physiology and pharmacology of the nervous system). Pergamon Press, New York, 1961.
- BALDWIN E. *Dynamic aspects of biochemistry*. University Press, Cambridge, 1952.
- BARNETT H. A staining method for L.D.H. isoenzymes on cellulose acetate and some observations on the « nothing » reaction. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- BASU D.K. et BACHHAWAT B.K. Purification of uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase from human brain. *J. Neurochem.*, 7, 174, 1961.
- BELL J.L. et BARON D.N. Isoenzymes of isocitric dehydrogenase. *Biochem. J.*, 82, 1, 5P, 1962.
- BERGREN W. R., STURGEON P. et ITANO H.A. Zone electrophoresis of abnormal hemoglobin. *Acta Haemat.*, 12, 3, 160, 1954.
- BERTRAND D. In: Javillier M. et Bertrand D. La composition élémentaire des organismes. *Traité de Biochimie Générale*. Tome I, fasc. 1, 64. Masson, Paris, 1959.
- BONAVITA V. et GUARNIERI R. Kinetic properties of lactate dehydrogenase isozymes in the nervous tissue. *Septième Congrès International de Neurologie*, Rome, 1961.

- BONAVITA V. Regional, comparative and ontogenetic studies on lactate dehydrogenase of nervous system. *International Neurochemistry Symposium on enzymic activity of the central nervous system*. Göteborg, 1962.
- BONAVITA V. et GUARNIERI R. Lactic dehydrogenase isozymes in the nervous system. I. The reaction of isozymes with diphosphopyridine nucleotide analogues and their inhibition by sodium metabisulfite. *Biochim. Biophys. Acta*, 59, 634, 1962.
- BONAVITA V., PONTE F. et AMORE G. Lactate dehydrogenase isozymes in the developing rat brain. *Nature*, 196, 4854, 576, 1962.
- BONAVITA V. Molecular evolution of lactate dehydrogenase in the developing nervous tissue, in Shade J.P. et Purpura D.P. *Development and maturation of the brain* (sous presse).
- BOYER S.H., FAIRER D.C. et WATSON-WILLIAMS E.J. Lactate dehydrogenase variant from human blood. Evidence for molecular subunits. *Science*, 141, 642, 1963.
- BRECKENRIDGE B.M., SCOTT S., STROMINGER J.L. et CRAWFORD E.J. Microdetermination of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase in brain. *J. Neurochem.*, 7, 228, 1961.
- BRECKENRIDGE B.M. et CRAWFORD E.J. The quantitative histochemistry of the brain. Enzymes of glycogen metabolism. *J. Neurochem.*, 7, 234, 1961.
- BRECKENRIDGE B.M. et CRAWFORD E.J. Glycogen phosphorylase in brain. *J. Neurochem.*, 9, 383, 1962.
- BROMAN L. Separation and characterization of two coeruleplasmins from human serum. *Nature*, 182, 1655, 1958.
- BRUNNGRADER E.G. et ABOOD L.G. Mitochondrial glycolysis of rat brain and its relationship to the remainder of cellular glycolysis. *J. Biol. Chem.*, 235, 7, 1847, 1960.
- BUTT E.M. Use of emission spectrograph for study of inorganic elements in human tissues. *Amer. J. Clin. Path.*, 24, 4, 385, 1954.
- CAHN R.D., KAPLAN N.O., LEVINE L. et ZWILLING E. Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science*, 136, 962, 1962.
- CARAVAGLIOS R. et CHIAVERINI P. Paper electrophoresis of soluble proteins of the central nervous tissue. *Experientia*, 12, 303, 1956.
- CARTWRIGHT G., HODGES R.E., GUBLER C.J., MAHONEY J.P., DAUM K., WINTROBE M.M. et BEAN W.B. Studies on copper metabolism. XIII. Hepatolenticular degeneration. *J. Clin. Invest.*, 33, 11, 1487, 1954.
- CHANCE B. *Ciba Foundation Symposium on the regulation of cell metabolism*, 219. Wolstenholme G.E.W. et O'Connor C.M.J. Churchill, Londres, 1959.
- CHATAGNON A. Etudes sur les protéines solubles du tissu cérébral. *Ann. Biol. Clin.*, 3/4, 140, 1960.
- CLARK W.M. *Oxydation-reduction potentials of organic systems*. Williams and Wilkins Co, 1960.
- CONKLIN J.L., DEVEY M.M. et MAY B. On the heterogeneity of lactic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 3, 365, 1962.
- CONNELL G.E. et SMITHIES O. Human haptoglobins: estimation and purification. *Biochem. J.*, 72, 1, 115, 1959.
- CORI G.T. et CORI C.F. The kinetics of the enzymatic synthesis of glycogen from glucose 1 phosphate. *J. Biol. Chem.*, 135, 733, 1940.
- CUMINGS J.N. The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepatolenticular degeneration. *Brain*, 71, 410, 1948.
- CUMINGS J.N. et KREMER M. *Biological aspects of neurological disorders*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1959.
- D'ADDABBO A. et KLAUS D. I^{131} labelling of lactic dehydrogenase. *Acta Isotop.*, 1, 1, 39, 1961.
- DE DUVE C. et BERTHET J. The use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes. *Int. Rev. Cytol.*, 3, 225, 1954.
- DESREUX V. et HERRIOTT R.M. Existence of several active components in crude pepsin preparations. *Nature*, 144, 287, 1939.
- DICKENS F. et GLOCK G.E. Direct oxidation of glucose 6 phosphate, 6 phosphoglucate and pentose 5 phosphate by enzymes of animal origin. *Biochem. J.*, 50, 81, 1951.
- DINGMAN W., SPORN M.B. et DAVIES R.K. The chemical fractionation of rat brain proteins. *J. Neurochem.*, 4, 154, 1959.
- DIXON M. et WEBB E.C. *Enzymes*. Longmans, Green and Co, Londres, 2^e édition, 1958.
- DOUNCE A.L., in Sumner and Myrback, *The Enzymes*, vol. 1, 187, Academic Press, New York, 1951.

- DUBACH U.C. Diagnostic applications of L.D.H. isoenzymes studied by thermal inactivation method. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- FISHER D.A. *Statistical methods for research workers*. Oliver and Boyd, Londres, 1936. Traduction française: *Les méthodes statistiques adaptées à la recherche scientifique*. P.U.F., Paris, 1947.
- FISHER R.A. et YATES F. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. Oliver and Boyd, Londres, 2^e édition, 1943.
- FLEXNER L.B., FLEXNER J.B., ROBERTS R.B. et DE LA HABA G. Lactic dehydrogenase of the developing cerebral cortex and liver of the mouse and guinea pig. *Developm. Biol.*, 2, 4, 313, 1960.
- FLEXNER L.B., DE LA HABA G. et FLEXNER J.B. Further studies on the components of lactic dehydrogenase of cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 9, 313, 1962.
- GATSTON A.W. et McCUNE D.C. An analysis of gibberellin-auxin interaction and its possible metabolic basis, in Klein R.M. *4th International Conference on Plant Growth Regulation*. Yonkers N.Y., 1959. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 1961.
- GARAY A.S. et FARAGO M. Papierelektrophoretische Trennung Peroxydasewirkender Agenten aus Pflanzen. *Phyton*, 13, 55, 1959.
- GERHARDT W. et CLAUSEN J. Biochemical aspects of individual dehydrogenase isozymes in normal and malignant tissue. XI^e Colloque sur les « Protides dans les liquides biologiques », Bruges, mai 1963 (sous presse).
- GERHARDT W., CLAUSEN J. et ANDERSEN H. Electrophoretic patterns of extractable proteins and enzymes in embryonic and adult brains. *Acta Neurol. Scand.*, 39, 1, 1963.
- GLOCK G.E. et McLEAN P. Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumors. *Biochem. J.*, 56, 171, 1954.
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A. Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 67, 1955.
- GREGORY K.F. et WROBLEWSKI F. Preparation and properties of purified antilactic dehydrogenase. *J. Immunol.*, 81, 359, 1958.
- GUHA S.B. et CHAKRAVARTY H.S. Paper electrophoresis of soluble proteins of rat brain. *Ann. Biochem.*, 20, 52, 1960.
- HAKALA M.T., GLAID A.J. et SCHWERT G.W. Kinetics and specificity of lactic dehydrogenase. *Fed. Proc.*, 12, 213, 1953.
- HAKALA M.T., GLAID A.D. et SCHWERT G.W. Lactic dehydrogenase. II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. *J. Biol. Chem.*, 221, 191, 1956.
- HARRIS J.L., SANGER F. et NAUGHTON M.A. Species differences in insulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 427, 1956.
- HAUPT F. et GIERSSBERG H. Untersuchungen über die Heterogenität und Organspezifität von Enzymen, speziell der Milchsäuredehydrogenase innerhalb der Wirbeltierreiche. *Naturwissenschaften*, 45, 268, 1958.
- HAWKINS D.F. et WHYLEY G.A. L.D.H. isoenzymes in human placenta. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- HAYMAN S. et ALBERTY R.A. The isolation and kinetics of two forms of fumarase from Torula yeast. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 812, 1961.
- HESS B. DPN-dependent enzymes in serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 75, 1, 292, 1958.
- HESS B. Untersuchungen über die Heterogenität der Serum fermenten und ihre Verwendung als organspezifische Indikatoren Zellulärer Funktionen. *Klin. Wschr.*, 36, 985, 1958.
- HESS B. et WALTER S.I. Chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase of human tissue and serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 890, 1961.
- HESS B., SCARPELLI D.G. et PEARSE A.G.E. The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 753, 1958.
- HILL B.R. Further studies of the fractionation of lactic dehydrogenase of blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 75, 1, 304, 1958.
- HILL B.R. et MEACHAM E.J. Separation and characterization of lactic dehydrogenases from serum and formed elements of human blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 868, 1961.
- HIRS C.H.W., STEIN W.H. et MOORE S. Chromatography of proteins. Ribonuclease. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1893, 1951.
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 200, 493, 1953.

- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. Investigations in serum copper. I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem. Scand.*, 1, 944, 1947.
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper containing protein and a description of some of its properties. *Acta Chim. Scand.*, 2, 550, 1948.
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. *First International Congress of Biochemistry. Abst. Comm.* 367, Cambridge, 1949.
- HOLMBERG C.G. et LAURELL C.B. Investigations in serum copper. III. Coeruloplasmin as an enzyme. *Acta Chem. Scand.*, 5, 477, 1951.
- HOLTER H. Localization of enzymes in cytoplasm. *Adv. in Enzym.*, 13, 1, 1952.
- HOTTA S.S. Glucose metabolism in brain tissue: the hexose monophosphate shunt and its role in glutathione reduction. *J. Neurochem.*, 9, 43, 1962.
- HUNT J.A. et INGRAM V.M. The chemical effects of gene mutations in some abnormal human haemoglobins, in Neuberger A. *Symposium on protein structure*. Ed. Wiley, 148, New York, 1958.
- HUNTER R.L. et MARKERT C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1294, 1957.
- ITANO H.A. et PAULING L. Difference in electrophoretic behavior of sickle cell hemoglobin and normal human hemoglobin. *Fed. Proc.*, 8, 209, 1949.
- JERMYN M.A. et THOMAS R. Multiple components in horse radish peroxidase. *Biochem. J.*, 56, 631, 1954.
- JOHNSON M.K. The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.*, 77, 610, 1960.
- KAJI A., TRAYSER K.A. et COLOWICK S.P. Multiple forms of yeast hexokinase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 798, 1961.
- KAPLAN N.O., CIOTTI M.M. et STOLZENBACH R.E. Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 221, 833, 1956.
- KAPLAN N.O., CIOTTI M.M., HAMOLSKY M. et PIEBER R.E. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science*, 131, 392, 1960.
- KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M. Evolution and differentiation of dehydrogenases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 701, 1961.
- KECK K. Nuclear and cytoplasmic factors determining the species specificity of enzyme proteins in Acetabularia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 741, 1961.
- KECK K. CHOULES E.A. The differential binding of lactate dehydrogenase isozymes to ribonucleoprotein particules. *Arch. Biochem.*, 99, 2, 205, 1962.
- KING E.J. et CAMPBELL D.M. International enzyme units. An attempt at international agreement. *Clin. Chim. Acta*, 6, 3, 301, 1961.
- KUNITZ M. Formation of new crystalline enzymes from chymotrysin. Isolation of beta and gamma chymotrypsin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 207, 1938.
- KLINGENBERG M., SLENCZKA W. et RITT E. Vergleichende Biochemie der Pyridinucleotid-Systeme in Mitochondrien verschiedener organe. *Biochem. Zschr.*, 332, 47, 1959.
- KLINGENBERG M. et BUCHER T. Flugmuskelmitochondrien aus Locusta Migratoria mit Atmungskontrolle, Aufbau und Zusammensetzung der Atmungskette. *Biochem. Ztschr.*, 331, 4, 312, 1959.
- KLINGENBERG M. et BUCHER T. Biological oxidations. *Ann. Rev. Biochem.* Palo Alto, California, 29, 669, 1960.
- KOEHLIN B.A. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXVIII. The β^1 metal-combining proteins of human plasma. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2649, 1952.
- KONDO K. et MORITA Y. Phytoperoxidases. II. Isolation and purification of sweet potato peroxidases and their absorption spectra. *Bull. Res. Inst. Food Sci. (Kyoto Univ.)*, 10, 33, 1952.
- KOWLESSAR O.D., HAEFFNER L.J. et RILEY E.M. Localization of serum leucine aminopeptidase, 5 nucleotidase and non specific alkaline phosphatase by starch gel electrophoresis: clinical and biochemical significance in disease states. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 836, 1961.
- KREBS E.G. Yeast glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase. I. Electrophoresis of fractions precipitated by nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 200, 471, 1953.
- LAUFER H. Forms of enzymes in insect development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 825, 1961.
- LE BARON F.N. et FOLCH J. Chemical composition of the mammalian nervous system, in Richter D. *Metabolism of the nervous system*. Pergamon Press, Londres, 1957.

- LE BARON F.N. et FOLCH J. The effect of pH and salt concentration on aqueous extraction of brain proteins and lipoproteins. *J. Neurochem.*, 4, 1, 1959.
- LELOIR L.F. Enzymic isomerization and related processes. *Adv. in Enzym.*, 14, 193, 1953.
- LELOIR L.F. et CARDINI C.E. The biosynthesis of sucrose. *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 6084, 1954.
- LELOIR L.F., OLAVARRIA J.M., GOLDEMBERG S.H. et CARMINATTI H. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem.*, 81, 2, 508, 1959.
- LENTI C. et CAFIERO M. On glycolysis in the chicken embryo. *Experientia*, 7, 4, 146, 1951.
- LOEWUS F.A., OFNER P., FISHER H.F., WESTHEIMER F.H. et VENNESLAND B. The enzymatic transfer of hydrogen. II. The reaction catalyzed by lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 202, 699, 1953.
- LOEWUS F.A. et STAFFORD H.A. The enzymatic transfer of hydrogen by glyceric and lactic dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 235, 11, 3317, 1960.
- LÖWENTHAL A. *Composition du cerveau en certains éléments minéraux et essai sur leur signification en pathologie*. Ed. Acta Medica Belgica, Bruxelles, 1958.
- LÖWENTHAL A., VAN SANDE M. et KARCHER D. Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in serum, cerebrospinal fluid and brain extracts in man and sheep. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 988, 1961.
- LÖWENTHAL A., VAN SANDE M. et KARCHER D. Fractionnement électrophorétique des déshydrogénases de l'acide lactique et de l'acide malique du liquide céphalorachidien et des extraits cérébraux chez l'homme et l'animal. *Pure Appl. Chem.*, 3, 3-4, 411, 1961.
- LÖWENTHAL A., VAN SANDE M., KARCHER D. et RICHARD J. Proteins and enzymes of the nervous system in different species. *Colloquium of Comparative Neurochemistry*, St. Wolfgang, 1962 (sous presse).
- LYNEN F. et KOENIGSBERGER R. Zum Mechanismus der Pasteur'schen Reaktion: Der Phosphat-Kreislauf in der Hefe und seine Beeinflussung durch 2,4 Dinitrophenol. Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. *Annal. (Liebig). Der Chemie*, 573, 60, 1951.
- MCCUNE D.C. Multiple peroxydases in corn. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 723, 1961.
- MCGEACHIN R.L. et REYNOLDS J.M. Serological differentiation of amylase isozymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 996, 1961.
- McILWAIN H. *Biochemistry and the Central Nervous System*. J. and A. Churchill, Londres, 1955.
- MALMSTRÖM B.G. The purification of yeast enolase by zone electrophoresis and ion-exchange chromatography and the existence of several active forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 58, 1957.
- MANDELSTAM J. Studies in biochemical adaptation. The « Mass Action » theory of enzyme adaptation. *Biochem. J.*, 51, 674, 1952.
- MARKERT C.L. et MÖLLER F. Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45, 753, 1959.
- MARKERT C.L. et HUNTER R.L. The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 42, 1959.
- MARKERT C.L. et APPELA E. Physicochemical nature of isozymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 678, 1961.
- MARKERT C.L. Isozymes in kidney development, in *Hereditary, developmental and immunological aspects of kidney disease*. Proc. of the Thirteenth Annual Conference on the kidney, Oct. 1961. Metcalf J., Northwestern University Press, Evanston, Illinois.
- MARKERT C.L. Lactate dehydrogenase isozymes. Dissociation and recombination of subunits. *Science*, 140, 1329, 1963.
- MARTIN A.J.P. et PORTER R.R. The chromatographic fractionation of ribonuclease. *Biochem. J.*, 49, 215, 1951.
- MEISTER A. Reduction of α , γ diketoacids and α ketoacids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 184, 117, 1950.
- MELNICK P.J. et LAWRENCE S.H. Histochemical enzyme technics applied to starch gel electrophoresis. *Premier Congrès International d'Histochemie et de Cytochimie*. Résumés, 80 et 112. Pergamon, Paris, 1960.
- MITIDIERI E., RIBERIO L.P., AFFONSO O.R. et VILLELA G.G. Localization of xanthine dehydrogenase in rat serum by paper electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 587, 1955.
- MONOD J. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Herman, Paris, 1942.

- MONOD J. et COHN M. Sur la nature du phénomène de diauxie. *Ann. Inst. Pasteur*, 71, 37, 1945.
- MONOD J. et COHN M. La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique). *Adv. in Enzym.*, 13, 67, 1952.
- MOORE R.W. et WROBLEWSKI F. L.D.H. production in tissue culture of normal, transformed and malignant human cell lines. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 98, 782, 1958.
- MOORE B.W. et LEE R.H. Chromatography of rat liver soluble proteins and localization of enzyme activities. *J. Biol. Chem.*, 235, 1359, 1960.
- MOORE B.W. et ANGELETTI P.U. Chromatographic heterogeneity of some enzymes in normal tissue and tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 659, 1961.
- NACE G., SUYAMA T. et SMITH N. Early development of special proteins, in *Symposium of International Inst. of Embryol.*, Pallanza, Italie, 1961.
- NACHLAS M.M., WALKER W.H. et SELIGMAN A.M. A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 29, 1958.
- NACHLAS M.M., MARGULIES S.I., GOLDBERG J.B. et SELIGMAN A.M. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.*, 1, 317, 1960.
- NEILANDS J.B. Studies on lactic dehydrogenase of heart. Purity, kinetics and equilibrium. *J. Biol. Chem.*, 199, 373, 1952.
- NEILANDS J.B. The purity of crystalline lactic dehydrogenase. *Science*, 115, 143, 1952.
- NEILANDS J.B. Lactic dehydrogenase of heart muscle, in *Methods in Enzymology*. Colowick S.P. et Kaplan N.O. Academic Press. New York, t. I, 449, 1955.
- NISSELBAUM J.S. et BODANSKY O. Reactions of L.D.H. from various rabbit organs with antirabbit muscle lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 234, 3276, 1959.
- NISSELBAUM J.S., SCHLAMOWITZ M. et BODANSKY O. Immunochemical studies of functionally similar enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 970, 1961.
- NISSELBAUM J.S. et BODANSKY O. Reactions of human tissue lactic dehydrogenase with anti-sera to human heart and liver lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 236, 401, 1961.
- NOVOA W.B., WINER A.D., GLAID A.J. et SCHWERT G.W. Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate. *J. Biol. Chem.*, 234, 5, 1143, 1959.
- OTTOLENGHI P. et DENSTEDT O.F., in Plageman P.G.W., Gregory K.F. et Wroblewski F. *J. Biol. Chem.*, 235, 8, 2288, 1960.
- PALLADIN A.V. Proteins of the nervous system under various conditions, in Richter. *Metabolism of the nervous system*. Pergamon Press, New York, 1957.
- PALLADIN A.V. et POLJAKOWA N.M. Zur Kenntnis der Proteine des Nerven Systems, in Brucke F. *Biochemistry of the Central Nervous System*. Pergamon Press, Londres, 185, 1959.
- PALLADIN A.V. Distribution of enzyme among the various subcellular units of the brain, in Kety et Elkes. *Regional Neurochemistry*. Pergamon Press, 1961.
- PAUL K.G. Die Isolierung von Meerrettichperoxydase. *Acta Chim. Scand.*, 12, 1312, 1958.
- PAUL J. et FOTTRELL P.F. Molecular variation in similar enzymes from different species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 668, 1961.
- PAULING L., ITANO H.A., SINGER S.J. et WELLS I.C. Sick cell anemia. A molecular disease. *Science*, 110, 543, 1949.
- PEARSE A.G.E. Intracellular localization of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 515, 1957.
- PEARSE A.G.E. *Histochemistry theoretical and applied*. J. et A. Churchill, Londres, 2^e édition, 1960.
- PFLEIDERER G., JECKEL D. et WIELAND T. Über die Einwirkung von sulfit auf einige DPN hydrierende Enzyme. *Biochem. Zschr.*, 338, 187, 1956.
- PFLEIDERER G., JECKEL D. et WIELAND T. Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäuredehydrogenasen. I. Die schützende Wirkung von coenzym-Addukten gegenüber denaturierenden Agentien. *Biochem. Zschr.*, 329, 104, 1957.
- PFLEIDERER G. et JECKEL D. Individuelle Milchsäuredehydrogenasen bei verschiedenen Säugetieren. *Biochem. Zschr.*, 329, 370, 1957.
- PFLEIDERER G., JECKEL D. et WIELAND T. Bedeutung von SH-Gruppen für die enzymatische Aktivität-Studien an Milchsäure dehydrogenase aus Schweineherz. *Arch. Biochem.*, 83, 1, 275, 1959.

- PFLEIDERER G., JECKEL D. et WIELAND T. Über den Wirkungsmechanismus der Milchsäure-dehydrogenasen. II. Zur Frage des Zinkgehalts und der SH Gruppen. *Biochem. Zschr.*, 330, 296, 1958.
- PFLEIDERER G. et WACHSMUTH E.D. Alters- und Funktion abhängige differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher organs. *Biochem. Zschr.*, 334, 185, 1961.
- PFLEIDERER G. et WACHSMUTH E.D. Die heterogenität der Lactatdehydrogenase in Entwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen. *Klin. Wschr.*, 39, 352, 1962.
- PHILIP J. et VESELL E.S. Sequential alterations of lactic dehydrogenase isozymes during embryonic development and in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 110, 3, 582, 1962.
- PLAGEMANN P.G.W., GREGORY K.F. et WROBLEWSKI F. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. I. Distribution of L.D.H. in rabbit and human tissues. *J. Biol. Chem.*, 235, 8, 2282, 1960.
- PLAGEMANN P.G.W., GREGORY K.F. et WROBLEWSKI F. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 235, 8, 2288, 1960.
- POLONOVSKI J. Structure et fonction des protéines. *Presse Méd.*, 71, 14, 1963.
- POLYAKOVA N.M. et LISHKO V.K. Fractionnement des protéines cérébrales. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 34, 1, 10, 1962.
- PORTER H. et FOLCH J. Fractionation of brain copper protein. *Fed. Proc.*, 13, 275, 1954.
- PORTER H. et FOLCH J. Fractionation of brain copper proteins, in Korey S.R. et Nurnberger J.I. *Neurochemistry*, 40. *Progress in Neurobiology*. P.B. Hoeber, Im. New York, 1956.
- PORTER H. et FOLCH J. Brain copper-protein fractions in the normal and in Wilson's disease. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 77, 8, 1957.
- PORTER H. et FOLCH J. Cerebrocuprein I. A copper containing protein isolated from brain. *J. of Neurochem.*, 1, 260, 1957.
- PORTER H. et AINSWORTH S. Reaction of brain copper proteins with sodium diethyl-dithiocarbamate in normal and in hepatolenticular degeneration. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 98, 277, 1958.
- PORTER H. et AINSWORTH S. The isolation of copper containing protein, cerebrocuprein I from normal human brain. *J. of Neurochem.*, 5, 1, 91, 1959.
- RACKER E. et WU R. *Ciba Foundation Symposium on the regulation of cell metabolism*, 205. Churchill, Londres, 1959.
- RACKER E. et GATT S. Interactions of glycolysis and oxidative pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 72, 12, 427, 1959.
- RICHARD J. et NEIMAREVIC D. Proteines solubles de quelques structures corticales et profondes du cerveau humain. Etude électrophorétique en agar. *Acta Neurol. et Psychiatr. Belg.*, 62, 12, 1079, 1962.
- RICHTERICH R., GAUTIER E., EGLI W., ZUPPINGER K. et ROSSI E. Progressive Muskeldystrophie. I. Die Heterogenität der Serum lactat-Dehydrogenase. *Klin. Wschr.*, 39, 7, 346, 1961.
- RICHTERICH R., SCHAFROTH P. et AEBI H. A study of lactic dehydrogenase isoenzyme pattern of human tissues by adsorption-elution on sephadex-D.E.A.E. *Clin. Chim. Acta*, 8, 178, 1963.
- ROBUSCHI L. et BENASSI G. Frazionamento elettroforetico di estratti acquosi di tessuto cerebrale. *Giorn. Psychiat. e Neuropath.*, 85, 183, 1957.
- SANKAR S. Enzymatic activity of ceruloplasmin. *Fed. Proc.*, 18, 441, 1959.
- SAYRE S.W. et HILL B.R. Fractionation of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 96, 695, 1957.
- SCHAPIRA G., DREYFUS J.C. et SCHAPIRA F. Formes moléculaires multiples de la L.D.H. dans les maladies du muscle. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- SCHLAMOWITZ M. Specificity of dog intestinal phosphatase antiserum. *J. Biol. Chem.*, 206, 369, 1954.
- SCHLAMOWITZ M. Immunochemical studies on alkaline phosphatases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 75, 1, 373, 1958.
- SCHLAMOWITZ M. et BODANSKY O. Tissue sources of human serum alkaline phosphatase as determined by immunochemical procedures. *J. Biol. Chem.*, 234, 1433, 1959.

- SCHNEIDER W.C. *Proceedings of the third International Congress of Biochemistry*, Brussel, 305. Academic Press, New York, 1955.
- SCHULTZE H.E. *Z. Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft. f. physikal. Chemie*, 60, 262, 1956.
- SCHWARZ D. Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, 46, 1210, 1960.
- SCHWIMMER S. Theory of double pH optima of enzymes. *J. Theor. Biol.*, 3, 1, 102, 1962.
- SHAW W.N. et STATIE W.C. Two identical Embden-Meyerhoff enzyme systems in normal rat diaphragms differing in cytological location and response to insulin. *J. Biol. Chem.*, 234, 10, 2491, 1959.
- SHIFRIN S., KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M. Fluorescence studies of coenzyme binding to beef heart lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 234, 6, 1555, 1959.
- SHIFRIN S. et KAPLAN N.O. Coenzyme binding. *Adv. in Enzym.*, 22, 337, 1960.
- SINGER T.P. et KEARNEY E.B. Chemistry, metabolism and scope of action of the pyridine nucleotide coenzymes. *Adv. in Enzym.*, 15, 79, 1954.
- SINGER T.P. et KEARNEY E.B. Solubilization, assay and purification of succinic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 15, 151, 1954.
- SMITHIES O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, 629, 1955.
- SMITHIES O. An improved procedure for starch gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, 71, 585, 1959.
- SPIEGELMAN S. Factors modulating the biochemical expression of genetic systems in Sutton H.E. *Genetics: Genetic information and the control of protein structure and function*, 189-190. Macy J. Jr Foundation, New York, 1960.
- STADTMAN E.R., COHEN G.N. et LE BRAS G. Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia Coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 952, 1961.
- STOTZ E. The estimation and distribution of cytochrome oxidase and cytochrome C in rat tissues. *J. Biol. Chem.*, 131, 555, 1939.
- STRAUB F.B. Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. *Biochem. J.*, 34, 483, 1940.
- TALLAN H.H. et STEIN W.H. Studies on lysozyme. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 2976, 1951.
- TALLAN H.H. et STEIN W.H. Chromatographic studies on lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 200, 507, 1953.
- TERAYAMA H. et VESTLING C.S. Sodium sulfide inhibition of liver lactic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 586, 1956.
- TER MEULEN H., in Javillier M. et Bertrand D. *La composition élémentaire des organismes. Traité de Biochimie Générale*. T. I, fasc. 1, 64. Masson, Paris, 1959.
- THEORELL H. Heme-linked groups and mode of action of some hemoproteins. *Adv. in Enzymol.*, 7, 265.
- THEORELL H. Kinetics and equilibria in the liver alcohol dehydrogenase system. *Adv. in Enzymol.*, 20, 32.
- THOMPSON R.H.S. The regional distribution of copper in human brain, in Kety S.S. et Elkes J. *Regional Neurochemistry*, 102, Varenna, Italy. Pergamon Press, 1961.
- THORNE C.J.R. Characterization of two malic dehydrogenases from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 175, 1960.
- TIMASHEFF S.N., STURTEVANT J.M. et BIER M. On the electrophoretic heterogeneity of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 243, 1956.
- TONINI G. et MISSERE G. Comportamento elettroforetico di estratti proteici cerebrali in tamponi ad alta forza ionica. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 33, 204, 1957.
- TOWER D.B., WHERRET J.R. et McKHANN G.M. Functional implications of metabolic compartmentation in the central nervous system. Interrelationships of cellular proteins and aminoacids, fluid spaces and electrolytes and oxidative metabolism as delineated by ammonia, in Kety S.S. et Elkes J. *Regional Neurochemistry*, 65, Varenna, Italy. Pergamon Press, 1961.
- TRAYSER K.A. et COLOWICK S.P. Properties of crystalline hexokinase of yeast. IV. Multiple forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 1, 177, 1961.
- TSAO M. Heterogeneity of tissue dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 90, 234, 1960.
- VALLEE B.L. et WACKER W.E.C. Zinc, a component of rabbit muscle lactic dehydrogenase. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 1771, 1956.
- VALLEE B.L. Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.*, 39, 3, 443, 1959.

- VAN DER HELM H.J. L glutamate dehydrogenase isoenzyme. *Nature*, 194, 4830, 773, 1962.
- VAN DER HELM H.J. Isoenzymes in different parts of the brain. *J. of Neurochem.*, 9, 325, 1962.
- VAN EYS J., STOLZENBACH F.E., SHERWOOD L. et KAPLAN N.O. The enzyme-coenzyme-substrate complexes of pyridine nucleotide dependent dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 63, 1958.
- VAN EYS J., SAN PIETRO A. et KAPLAN N.O. A mechanism for pyridine-nucleotide dependent dehydrogenases. *Science*, 127, 1443, 1958.
- VAN SANDE M. Contribution à l'étude des protéines cérébrales et de deux enzymes (la dehydrogenase de l'acide lactique et la dehydrogénase de l'acide malique) du système nerveux central. Thèse Poitiers, 1962. *Ann. Soc. Roy. Sc. Méd. et Nat. Bruxelles*, 15, 1-2, 1962.
- VAN SANDE M., KARCHER D. et LÖWENTHAL A. Note on the multiplicity of malate dehydrogenase (MDH). *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- VESELL E.S. et BEARN A.G. Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum fractions. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 94, 96, 1957.
- VESELL E.S. et BEARN A.G. Observations on the heterogeneity of malic and lactic dehydrogenase in human serum and red blood cells. *J. Clin. Invest.*, 37, 672, 1958.
- VESELL E.S. et BEARN A.G. The heterogeneity of L.D.H. and M.D.H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 75, 286, 1958.
- VESELL E.S., FELDMAN M.P. et FRANK E.D. Plasma lactic dehydrogenase activity in experimental hemorrhagic shock. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 101, 644, 1959.
- VESELL E.S. Significance of the heterogeneity of lactic dehydrogenase activity in human tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 877, 1961.
- VESELL E.S. et BEARN A.G. Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissue. *J. Clin. Invest.*, 40, 586, 1961.
- VESELL E.S. Localization of an isozyme of lactic dehydrogenase to nuclei. XI^e Colloque sur les Protides des liquides biologiques, Bruges, mai 1963 (sous presse).
- VOGEL H.J. On the glutamate-proline-ornithine interrelation in various micro-organisms, in McElroy W.D. et Glass H.B. *A Symposium on aminoacid metabolism*, 335. The Johns Hopkins Press, Baltimore, Md., 1955.
- WACKER W.E.C., ULMER D.D. et VALLEE B.L. Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *New Engl. J. Med.*, 255, 449, 1956.
- WAELSCH H. Some problems of metabolism in relation to the structure of the nervous system, in *Fourth International Congress of Biochemistry*, vol. III, *Biochemistry of the central nervous system*, 36. Pergamon Press, 1959.
- WAELSCH H. An attempt at integration of structure and metabolism in the nervous system, in *Proc. of the Second International Meeting of Neurobiologists*. Elsevier Publishing Company, The Netherlands, 1960.
- WAELSCH H. Compartmentalized biosynthetic reactions in the central nervous system, in *Regional Neurochemistry*, Varenna, Italy, 57. Pergamon Press, 1961.
- WARBURG O. *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Springer, Berlin, 1926.
- WARBURG O. *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*. Ed. Félix Alcan. T. I et II, Paris, 1928.
- WARBURG O. *Über die Entstehung der Krebszellen*. *Naturw.*, 42, 401, 1955.
- WARBURG O., GAWEHN K. et GEISSLER A.W. Stoffwechsel von embryonalen Zellen und von Krebszellen. *Zschr. Naturf.*, 11b, 657, 1956.
- WEBER G. Effect of six days starvation on rat liver lactic dehydrogenase activity. *J. Nutrit.*, 71, 2, 156, 1960.
- WHITE W.F. et GROSS A.M. Studies on adrenocorticotropin. XIV. Action of bovine fibrinolysin and of liver cathepsin on corticotropin. Effect on biological activity. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 1141, 1957.
- WIELAND T. et PFLEIDERER G. Nachweis der Heterogenität von Milchsäure-dehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese. *Biochem. Zschr.*, 329, 112, 1957.
- WIELAND T., PFLEIDERER G. et ORTANDERL F. Vergleiche der Milchsäuredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen. *Biochem. Zschr.*, 331, 103, 1959.

- WIELAND T., PFLEIDERER G. et RAJEWSKY K. Verschiedenheit der Milchsäure dehydrogenasen. V. Papierelektrophoretischer Vergleich der tryptischen Spaltprodukte. *Zschr. Naturforsch.*, 15b, 434, 1960.
- WIELAND T. et PFLEIDERER G. Chemical differences between multiple forms of lactic acid dehydrogenases. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 94, 3, 691, 1961.
- WIEME R.J. *Studies on agar gel electrophoresis. Techniques. Applications.* Arscia Uitgaven N.V., Bruxelles, 1959.
- WIEME R.J. et DEMEULENAERE L. Enzymo-électrophorèse de la déshydrogénase de l'acide lactique, test sélectif d'intégrité parenchymateuse. *Acta Gastro-Enterol. Belg.*, 22, 69, 1959.
- WIEME R.J. Etude par enzymo-électrophorèse des déshydrogénases de l'acide lactique et de la déshydrogénase du sorbitol dans divers tissus chez le rat et la souris blanche. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, Paris, 41, 2-3, 235, 1959.
- WIEME R.J. Sur la multiplicité de la lactico-déshydrogénase sérique chez l'homme, in *Colloque sur les enzymes en chimie clinique*, Gand, 99. Ed. Arscia, Bruxelles, 1960.
- WIEME R.J. et VAN MAERCKE Y. The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 94, 3, 898, 1961.
- WIEME R.J., VAN SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. et VAN DER HELM H.J. A modified technique for direct staining with nitro-blue tetrazolium of lactate dehydrogenase isoenzymes upon agar gel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 7, 750, 1962.
- WINER A.D., SCHWERT G.W. et MILLAR D.B.S. Lactic dehydrogenase. VI. Fluorimetric measurements of the complex of enzyme and reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 234, 5, 1149, 1959.
- WINER A.D., SCHWERT G.W. et MILLAR D.B.S. Lactic dehydrogenase. VII. Fluorescence spectra of ternary complexes of lactic dehydrogenase, reduced diphosphopyridine nucleotide and carboxylic acids. *J. Biol. Chem.*, 234, 5, 1155, 1959.
- WINER A.D. Purification and some kinetic properties of ox brain lactic and malic dehydrogenases. *Biochem. J.*, 76, 1, 5P, 1960.
- WINER A.D. Fluorescent studies of ox brain lactic and malic dehydrogenases. *Biochem. J.*, 76, 1, 1960.
- WROBLEWSKI F., ROSS C. et GREGORY K.F. Isoenzymes and myocardial infarction. *New Engl. J. Med.*, 263, 531, 1960.
- WROBLEWSKI F. et GREGORY K.F. Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 3, 912, 1961.
- WROBLEWSKI F. Diagnostic dissection by isoenzymes, in *Enzymes in clinical chemistry*, 385. *Proc. of the Second International Symposium on enzymes in clinical chemistry*, Gand. Butterworths, London, 1962.
- WUST H., SHON H. et BERG G. Isoenzyme der Lactatdehydrogenase (L.D.H.) und ihre thermische Inaktivierung in der diagnose innerer Krankheiten. *Klin. Wschr.*, 40, 22, 1169, 1962.
- WUST H. Thermische Inaktivierung von Serum und Organfermenten, *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*, Gand (Belgique), 1963.
- YUDKIN J., in Mandelstam J. *Biochem. J.*, 51, 674, 1952.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	5
Chapitre premier. — Position du problème	7
Chapitre II. — Historique	9
I. Problème général des isozymes	10
II. Problème particulier des isozymes de la LDH	15
A. Connaissances actuelles sur leurs propriétés physicochimiques, cinétiques et immunologiques	15
B. Hypothèses sur leur nature et leur rôle	20
C. Aspects particuliers liés à la phylogenèse, l'ontogenèse, la localisation et l'état pathologique	22
III. Conclusions	25
Chapitre III. — Techniques	27
I. Que met-on exactement en évidence par les techniques employées?	27
II. Les techniques proprement dites	28
1. Extraction et dosage des protéines hydrosolubles totales et de l'activité lacticodéshydrogénasique totale	28
2. Microélectrophorèse en agar des protéines et enzymoélectrophorèse en agar	32
3. Dosage des éléments minéraux dans les tissus nerveux et ses extraits	40
4. Techniques statistiques	42
III. Conclusions	45
Chapitre IV. — Résultats	47
I. Cas normaux.	47
1. Lacticodéshydrogénase.	47
A. LDH totale	47
B. Isozymes de la LDH	51

2. Protéines hydrosolubles	60
A. Taux des protéines totales des extraits	60
B. Fractions protéiques	60
3. Eléments minéraux	69
A. Concentrations en éléments minéraux du tissu nerveux	69
B. Concentrations en éléments minéraux des extraits et des culots de centrifugation du tissu nerveux	72
II. Cas pathologiques	74
1. Lactico-déshydrogénase	74
A. LDH totale	74
B. Isozymes de la LDH	78
2. Protéines hydrosolubles	84
A. Protéines totales	84
B. Fractions protéiques	84
3. Eléments minéraux	85
III. Conclusions	88
Chapitre V. — Corrélations statistiques	89
I. Résultats	89
1. Corrélations entre les activités isozymiques de la LDH et les éléments minéraux	89
2. Corrélations entre les activités des divers isozymes	89
3. Corrélations des éléments minéraux entre eux	90
4. Corrélations entre les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles	93
II. Rapports	93
1. Corrélations entre les activités isozymiques de la LDH et les éléments minéraux	93
2. Corrélations entre les activités des divers isozymes	94
3. Corrélations des éléments minéraux entre eux	94
4. Corrélations entre les éléments minéraux et les protéines hydrosolubles	96
III. Conclusions	96
Chapitre VI. — Discussion	98
I. Structures et cinétiques	99
II. Raisons d'existence. Etablissement d'une hypothèse de travail	103
1. Données analytiques	104
2. Données statistiques	108

ISOZYMES DE LA LDH DU TISSU NERVEUX	131
3. Données biochimiques	109
4. Données pathologiques	110
III. Conséquences de l'hypothèse de travail	113
1. Problèmes particuliers.	113
2. Généralisation de l'hypothèse	114
Chapitre VII. — Conclusions générales	117
Bibliographie	119

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Les sulfatides

Vu et approuvé :

Paris, le 9 décembre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

